

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

"Otto Körner", Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Hans Wilhelm Pau

**Optimierung einer Gefrierschliffmethode und  
Machbarkeitsstudie eines „Tissue Printing“-Verfahrens zur  
Beurteilung der cochleären Feinstruktur humaner  
Felsenbeinpräparate**

IN A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Mühlberg, Svea

geboren in Zittau

Rostock, 2011

Dekan der medizinischen Fakultät der Universität Rostock: Prof. Dr. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Hans Wilhelm Pau

Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie "Otto Körner", Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Detlef Behrend

Universität Rostock, Fakultät für Maschinenbau und Schiffstechnik, Lehrstuhl Werkstoffe für die Medizintechnik

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Timo Stöver

Direktor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Datum der Einreichung der Dissertation: 22.07.2011

Datum der Verteidigung der Dissertation: 15.05.2012

„Man schließe das Auge, man öffne, man schärfe das  
Ohr, und vom leisesten Hauch bis zum wildesten  
Geräusch, vom einfachsten Klang bis zur höchsten  
Zusammenstimmung, von dem heftigsten,  
leidenschaftlichen Schrei bis zum sanftesten Worte der  
Vernunft ist es nur die Natur, die spricht, ihr Dasein, ihre  
Kraft, ihr Leben und ihre Verhältnisse offenbart, so daß  
ein Blinder, dem das unendlich Sichtbare versagt ist, im  
Hörbaren ein unendlich Lebendiges fassen kann.“

**Johann Wolfgang von Goethe**

Zur Farbenlehre, Vorwort

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
I Tabellenverzeichnis.....	IV
II Abbildungsverzeichnis.....	V
III Abkürzungsverzeichnis.....	VII
<b>1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND AKTUELLER STAND DER FORSCHUNG .....</b>	<b>4</b>
2.1 <u>Anatomie und Histologie des Ohres</u> .....	4
2.1.1 Äußeres Ohr und Mittelohr .....	4
2.1.2 Innenohr.....	5
2.1.2.1 Knöchernes Labyrinth.....	5
2.1.2.2 Häutiges Labyrinth.....	6
2.1.2.3 Corti-Organ (Organum spirale cochleae).....	7
2.2 <u>Relevante antigene Strukturen</u> .....	10
2.2.1 Basalmembranen – Kollagen Typ IV .....	10
2.2.2 Gap junctions – Connexin 26 .....	12
2.3 <u>Physiologie des Hörvorgangs</u> .....	13
2.4 <u>Ätiologie und Pathophysiologie der Schwerhörigkeit und Ertaubung</u> .....	17
2.5 <u>Therapie mit Cochlear-Implantaten</u> .....	19
2.5.1 Aufbau und Funktion von Cochlear-Implantaten.....	20
2.5.2 Elektrodeninsertion .....	21
2.5.2.1 Operative Zugangswege .....	21
2.5.2.2 Insertionstraumata.....	22
2.5.2.3 Elektrodenlokalisierung.....	23
2.6 <u>Histologische Präparationsmethoden</u> .....	25
2.6.1 Probenvorbereitung.....	25
2.6.1.1 Chemische Fixierung.....	25
2.6.1.2 Physikalische Fixierung .....	25
2.6.1.3 Präparateinbettung .....	26
2.6.2 Schnitt- und Schliffpräparation .....	27
2.6.2.1 Schnittpräparation .....	27
2.6.2.2 Schliffpräparation .....	27
2.6.3 Verarbeitung von hartem Gewebe.....	28
2.7 <u>Methoden zur Evaluation der Elektrodeninsertion an post-mortem Felsenbeinpräparaten</u> .....	29
2.8 <u>Immunhistochemie</u> .....	37
2.8.1 Grundlagen .....	37
2.8.2 Immunhistochemische Methoden und Markersubstanzen zur Visualisierung der immunhistochemischen Reaktion.....	39



2.9	„Tissue Printing“	41
2.9.1	Vergleich von Nachweismethoden für Proteine	41
2.9.2	Entwicklung und Prinzipien des „Tissue Printing“-Verfahrens	42
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>45</b>
3.1	<u>Ermittlung der unteren Nachweisgrenze für fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Kollagen Typ IV</u>	46
3.1.1	Konstruktive Auslegung der Printträgerfassung	46
3.1.2	Versuchsdurchführung zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze für fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Kollagen Typ IV	47
3.1.3	Ergebnisse der Ermittlung der unteren Nachweisgrenze für fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Kollagen Typ IV	50
3.2	<u>Felsenbeinpräparate</u>	52
3.3	<u>Kryoschleifvorrichtung</u>	53
3.3.1	Kryoschleifvorrichtung vom Typ I	53
3.3.2	Prototyp einer weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung (Typ II)	54
3.3.3	Optimierung des Prototyps einer weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung	56
3.4	<u>Kryoschliffpräparation</u>	57
3.5	„Tissue Printing“	59
3.5.1	Auswahl der geeigneten Printmembran	59
3.5.2	Versuchsdurchführung „Tissue Printing“	60
3.5.3	Verfahren zur Maximierung der Anpresszeit beim „Tissue Printing“	62
3.5.3.1	„Tissue Printing“ mit vorheriger Ethanolspülung	62
3.5.3.2	„Tissue Printing“ mit vorheriger Glycerolbenetzung	63
3.6	<u>Immunhistochemische Färbung</u>	66
3.6.1	Versuchsdurchführung Immunfluoreszenzfärbung	68
3.6.1.1	Nachweis von Kollagen Typ IV	68
3.6.1.2	Nachweis von Connexin 26	69
3.7	<u>Dokumentation</u>	70
3.7.1	Stereomikroskopie	71
3.7.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	71
3.7.3	Mikro-Computertomographie	73
3.7.4	Arbeitsprotokoll und Datenarchivierung	75
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>77</b>
4.1	<u>Kryoschliffpräparation und „Tissue Printing“ bei in-situ liegender Elektrode</u>	77
4.2	<u>Verfahrensoptimierung und Entwicklung einer Standardprozedur</u>	78
4.2.1	„Tissue Printing“ mit vorheriger Ethanolspülung	79
4.2.2	„Tissue Printing“ mit vorheriger Glycerolbenetzung	80
4.2.3	Verfahrensoptimierung durch Veränderungen des Zeitpunktes der Kühlmittelauffüllung sowie der Schleifpapierkörnung	81
4.3	<u>Klassifikation zur Beurteilung der Qualität der physikalischen „Tissue Prints“</u>	84
4.4	<u>Immunhistochemische Färbung</u>	86
4.4.1	Nachweis von Kollagen Typ IV	87
4.4.2	Nachweis von Connexin 26	89

---

4.5	<u>Dokumentationsmethoden zur Darstellung cochleärer Strukturen in den Präparatschliffebenen und „Tissue Prints“</u> .....	91
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	95
5.1	<u>Eignung des „Tissue Printing“-Verfahrens zur Beurteilung der cochleären Feinstruktur humaner Felsenbeinpräparate</u> .....	97
5.1.1	Optimierung der Gefrierschliffmethode sowie des „Tissue Printing“-Verfahrens .....	97
5.1.2	Immunhistochemischer Nachweis transferierter Proteine .....	98
5.1.2.1	Nachweis von Connexin 26 in der Cochlea .....	99
5.1.2.2	Nachweis von Kollagen Typ IV in der Cochlea .....	99
5.1.3	„Tissue Printing“ kryofixierter und -geschliffener Felsenbeinpräparate als Methoden zur Evaluation der Elektrodeninsertion an post-mortem Felsenbeinpräparaten .....	100
5.2	<u>Weiterführende Untersuchungen</u> .....	104
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	106
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	109
	Thesen .....	123
	Selbstständigkeitserklärung.....	126
	Danksagung .....	127

# I Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Cochleäre Expression von Connexin 26 (Cx26) .....	13
Tabelle 2:	Ursachen erworbener Schwerhörigkeit.....	18
Tabelle 3:	Cochleäre Traumata: Art der Schädigung, Einschätzung der Schadens- folge und Gradeinteilung nach <i>Richter et al.</i> [123] .....	32
Tabelle 4:	Schema zur Beurteilung des cochleären Traumas nach <i>Eshraghi et al.</i> [134].....	32
Tabelle 5:	Verdünnungsreihe mit entsprechenden Kollagen Typ IV- Endkonzentrationen .....	48
Tabelle 6:	Immunhistochemische Färbung der mit humanem Kollagen Typ IV- Verdünnungen benetzten Nitrocellulosemembranen sowie ausgewählter „Tissue Prints“ .....	49
Tabelle 7:	Chemikalien und Lösungen für die immunhistochemische Färbung der mit humanem Kollagen Typ IV-Verdünnungen benetzten Nitrocellulose- membranen sowie ausgewählter „Tissue Prints“.....	50
Tabelle 8:	Übersicht der untersuchten Felsenbeinpräparate .....	53
Tabelle 9:	Durchführung des „Tissue Printings“ in den Vorversuchen .....	62
Tabelle 10:	Durchführung des „Tissue Printings“ mit vorheriger Ethanolspülung .....	63
Tabelle 11:	Verfahrensoptimierung „Tissue Printing“ mit vorheriger Glycerol- benetzung, Präparationsablauf.....	65
Tabelle 12:	Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter „Tissue Prints“ zum Nachweis von Connexin 26 .....	69
Tabelle 13:	Verwendete Chemikalien und Lösungen bei der Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter „Tissue Prints“ zum Nachweis von Connexin 26 .....	57
Tabelle 14:	Arbeitsprotokollbeispiel zur Machbarkeitsstudie des „Tissue Printing“- Verfahrens an kryofixierten und -geschliffenen Felsenbeinpräparaten.....	76
Tabelle 15:	Standardprozedur für die Durchführung des „Tissue Printings“ .....	83
Tabelle 16:	Klassifikation der Qualität der physikalischen Prints .....	85

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der anatomischen Strukturen des Ohres .....	5
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Canalis spiralis cochleae und des Corti-Organ.....	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung eines Cochlear-Implantates .....	21
Abbildung 4:	Aufsichtsdarstellung der Printrägerfassung .....	47
Abbildung 5:	Fluoreszenzmikroskopische Detektierung der Kollagen Typ IV-Verdünnungsreihe .....	51
Abbildung 6:	Prototyp der weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung vom Typ II.....	55
Abbildung 7:	Optimierter Prototyp der weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung.....	57
Abbildung 8:	Versuchsaufbau Glycerolbenetzung der Präparatschliffebene.....	64
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Strahlenganges durch ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop .....	72
Abbildung 10:	Humanes Felsenbeinpräparat A, Schliffebene Nr. 27 mit in der Scala tympani der basalen cochleären Windung liegenden Elektrode.....	77
Abbildung 11:	„Tissue Print“ Nr. 10 mit gräulich erscheinendem Elektrodenabrieb des humanen Felsenbeinpräparates A.....	78
Abbildung 12:	Humanes Felsenbeinpräparat A, Schliffebene Nr. 11 nach dem „Tissue Printing“ mit angefrorenen Resten der Nitrocellulose des Printrägers .....	79
Abbildung 13:	Humanes Felsenbeinpräparat A, Schliffebene 19 nach erfolgter Ethanolspülung.....	80
Abbildung 14:	Humanes Felsenbeinpräparat B, Schliffebenen direkt vor der Benetzung mit Glycerol in verschiedenen Stadien der Verfahrensoptimierung .....	82
Abbildung 15:	Übersicht der Qualitätsgrade physikalischer „Tissue Prints“ anhand des Ausmaßes der Printmembranschäden .....	84
Abbildung 16:	„Tissue Print“ Nr. 44 des humanen Felsenbeinpräparates B.....	85
Abbildung 17:	Printmembranausrisse des „Tissue Prints“ Nr. 68 im Bereich der basalen cochleären Windung des humanen Felsenbeinpräparates B .....	86
Abbildung 18:	„Tissue Print“ Nr. 69 des humanen Felsenbeinpräparates B, Querschnitt der unteren basalen cochleären Windung, Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV .....	88
Abbildung 19:	„Tissue Print“ Nr. 38 des humanen Felsenbeinpräparates B, Mesothel der Scala tympani, Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV .....	89

---

Abbildung 20:	„Tissue Print“ Nr. 70 des humanen Felsenbeinpräparates B, Immunfluoreszenzfärbung von Connexin 26.....	90
Abbildung 21:	Humanes Felsenbeinpräparat B mit der im Inneren lokalisierten Cochlea (anhand Mikro-CT-Daten rekonstruiertes dreidimensionales Modell).....	92
Abbildung 22:	Humanes Felsenbeinpräparat B, Schnittbild (Mikro-Computertomogram) ..	92
Abbildung 23:	Übersicht der angewandten Dokumentationsmethoden.....	94
Abbildung 24:	Humanes Felsenbeinpräparat B, Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV: „Tissue Print“ Nr. 72 (Übersichtsdarstellung der linken basalen cochleären Windung) und „Tissue Print Nr. 38 (endosteale Region im Bereich des Ligamentum spirale der linken basalen cochleären Windung).....	104

### III Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
ca.	circa
Ca	Calcium
CI	Cochlear-Implantat
CLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
cm	Zentimeter
CO <sub>2 solid</sub>	festes Kohlenstoffdioxid, Trockeneis
CT	Computertomographie
Cx	Connexin
dB	Dezibel
DIC	differentieller Interferenzkontrast
EDTA	Ethylendiamintetraacid
et al.	und andere ( <i>lateinisch</i> : et alii, et aliae)
etc.	und so weiter ( <i>lateinisch</i> : et cetera)
evtl.	eventuell
FB	Felsenbeinpräparat
g	Gramm
h	Stunde ( <i>lateinisch</i> : hora)
HE	Haematoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>englisch</i> : horseradish peroxidase)
Hz	Hertz
i.d.R.	in der Regel
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
K	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

---

KSV	Kryoschleifvorrichtung
Lig.	Ligamentum
M.	Musculus
m	Masse
min	Minute
Mm.	Musculi
mM	Millimol
mm	Millimeter
MMA	Methylmethacrylat
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N.	Nervus
N	Newton
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Nn.	Nervi
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
P	Phosphat
pAK	polyklonaler Antikörper
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>englisch</i> : Phosphate-buffered saline)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SiC	Siliciumcarbid
sog.	sogenannt
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>englisch</i> : Tris-buffered saline)
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
V.	Vena
Vv.	Venae
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Grundlage der menschlichen Kommunikation ist die Sprache, deren Erwerb eng an die Entwicklung von Intelligenz und Persönlichkeit gekoppelt ist. Voraussetzung für das Erlernen der Sprache und für die Kontrolle des Sprechens ist der Gehörsinn [1].

Bei fehlender Ausbildung des Gehörsinns oder erworbenem Ausfall der Sinneszellen des Corti-Organ oder Teilen der aufsteigenden Hörbahn wird von Gehörlosigkeit bzw. Taubheit gesprochen. Sind bei Intaktheit von Hörnerv und zentraler Hörbahn Schäden am Corti-Organ die alleinige Ursache der Gehörlosigkeit, spricht man von cochleärer Taubheit [2, 3].

Weltweit sind ca. 0,1% der Bevölkerung gehörlos [4]. Laut *Probst et al.* liegt die Inzidenz von angeborenen Hörstörungen bei ca. 1 von 1000 Neugeborenen pro Jahr, wobei in den folgenden Lebensjahren die Anzahl der bleibend hörgeschädigten Kinder um 50–90% steigt. Da mit zunehmendem Alter neben angeborenen auch erworbene Ursachen eine Hörstörung bedingen können, steigt die Inzidenz weiter an [2]. Infolge der krankheitsbedingten psychosozialen Beeinträchtigung der Betroffenen kommt der Therapie von Hörstörungen daher eine besondere Bedeutung zu.

Seit der Consensus Conference im Jahre 1995 ist das Cochlear-Implantat (CI) als Methode der Wahl bei cochleärer Taubheit etabliert [5]. Cochlear-Implantate sind implantierbare elektronische Hörprothesen, die durch direkte elektrische Reizung der Ganglienzellen im Ganglion spirale der Cochlea einen Höreindruck erzeugen [3].

Eine für die Entwicklung der Cochlear-Implantate entscheidende Entdeckung akustischer Wahrnehmung infolge elektrischer Stimulation wurde erstmals im Jahr 1800 von *Volta* beschrieben. 1930 lieferten *Wever und Bray* [6] durch ihre Studie an Katzen den Nachweis, dass in der Cochlea durch eine akustische Reizung elektrische Potentiale (Mikrophonpotentiale) generiert und in bestimmten Mustern auf den Hörnerv übertragen werden. Nach weiterführenden Studien zur Elektrostimulation bei Innenohrtaubheit [7, 8] und der Erarbeitung neuer operativer Zugangswege zum Mittelohr begannen die Arbeitsgruppen um *House et al.* [9] und *Doyle et al.* [10] Anfang der 1960er Jahre mit systematischen Studien zur klinischen Anwendung cochleärer elektrischer Stimulation. 1972 erfolgte durch *House et al.* [11] die erste Implantation eines einkanlig transkutan arbeitenden Cochlear-Implantates. Bereits 1974 zeigten *Merzenich et al.* [12], dass es möglich ist über mehrere getrennte, in der Scala tympani liegende Elektroden kleinere Segmente des Hörnervs einzeln zu erregen. Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung mehrkanaliger intracochleärer Implantate, welche 1978 sowohl durch *Clark* in Melbourne/Australien [13] als auch durch *Burian et al.* in



Wien/Österreich [14] erstmalig erfolgreich tauben Patienten implantiert wurden. Um mögliche, infolge der Elektrodeninsertion in die Scala tympani entstehende Innenohrschädigungen zu vermeiden, entwickelten *Banfai et al.* 1979 in Köln-Düren/Deutschland ein neues Implantationsverfahren. Zur Schonung intracochleärer Strukturen wurden ohne Eröffnung des Peri- oder Endolymphraumes die Elektroden auf die endosteale Auskleidung der Cochlea von außen aufgebracht (extrascalare OP-Methode) [15, 16]. Durch die Entwicklung pulsatil arbeitender Mehrkanalsysteme [17] und des Einsatzes digitaler Sprachprozessoren war seit Beginn der 1980er Jahre für Patienten mit Cochlear-Implantaten ein komplexes Verstehen von Sprache möglich [8, 18]. Seit der Einführung der erstmals 1991 von *Wilson et al.* beschriebenen „Continuous interleaved sampling strategy“ (CIS) konnte durch eine signifikant erhöhte digitale Übertragungsrate das Sprachverstehen kontinuierlich verbessert werden [19].

Somit konnten Cochlear-Implantate als Standardtherapie bei irreversibler cochleärer Taubheit im Kindes- und Erwachsenenalter etabliert werden. Durch die kontinuierliche Optimierung der Cochlear-Implantate und der Entwicklung schonender Insertionsmethoden konnte die Indikation auf Patienten mit Restgehör, bei denen trotz optimaler Hörgerätversorgung das Sprachverstehen nur ungenügend ist, erweitert werden [20, 21, 22, 23, 24, 25, 26].

Da Dislokationen und Frakturen der cochleären Membranen zu einer zusätzlichen Hörminderung führen können [13], muss bei der Elektrodeninsertion durch ein schonendes Verfahren die Minimierung derartiger insertionsbedingter Gewebstraumata gewährleistet werden. Vor der klinischen Anwendung muss das neu entwickelte Cochlear-Implantat daher im Rahmen von Vorstudien auf seine Tauglichkeit hin überprüft werden. Dabei kommt der Probeinsertion der Elektroden an ex-vivo Felsenbeinpräparaten und der anschließenden histologischen Aufarbeitung besondere Bedeutung zu. Hierfür sollten die verwendeten Felsenbeine möglichst nativ und ohne präparationsbedingte Artefakte sein. Da derartige Untersuchungen jedoch meist an eingebetteten Felsenbeinen erfolgten, wurde von *Herrmann et al.* [27, 28] eine schonende Gefrierschlifftechnik entwickelt, mit der native, kryofixierte Felsenbeinpräparate mit in-situ liegender Elektrode untersucht werden konnten. Ein Auftreten präparationsbedingter Artefakte konnte somit vermieden werden.

In der vorliegenden Arbeit soll die von *Herrmann et al.* [27] entwickelte Kryoschleifvorrichtung dahingehend optimiert werden, dass von den Gefrierschliffebenen in beliebiger Anzahl Gewebeabdrücke (sog. „Tissue Prints“) auf Nitrocellulosemembranen angefertigt werden können. Durch die Kryofixierung sollen die besonders empfindlichen cochleären Strukturen derart stabilisiert werden, dass durch die Druckeinwirkung beim „Tissue Printing“ ein

stereomikroskopisch gut beurteilbares Relief der Präparatschliffebene in der Nitrocellulosemembran erzeugt wird (sog. physikalischer Print). Infolge des während des „Tissue Printings“ stattfindenden Molekültransfers von der Präparatschliffebene auf die Nitrocellulosemembran entstehen außerdem sog. chemische Prints, die weitere Aussagen zur Strukturintegrität humaner Felsenbeinpräparate ermöglichen. Dafür sollen die transferierten Proteine mit der Methode der Immunfluoreszenz auf der Nitrocellulosemembran nachgewiesen werden. Ergänzend dazu sollen zur Beurteilung der cochleären Feinstruktur die Methoden der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie und der Mikro-Computertomographie erprobt werden.

## 2 Theoretische Grundlagen und aktueller Stand der Forschung

### 2.1 Anatomie und Histologie des Ohres

Im Ohr sind Gleichgewichts- und Gehörorgan zum Organum vestibulocochleare zusammengefasst.

Im Einzelnen setzt sich das Ohr aus dem äußeren Ohr (Auris externa), dem Mittelohr (Auris media) und dem Innenohr (Auris interna, Labyrinth) zusammen. Der Schall wird von der Auris externa aufgefangen. Über die Auris media wird die Schallenergie vom Trommelfell über die Gehörknöchelchen zur Auris interna übertragen. Das Hörorgan (Labyrinthus cochlearis), welches die durch Schallwellen hervorgerufenen Schwingungen in spezifische Nervenimpulse überführt, und das Rezeptororgan für den Gleichgewichtssinn (Labyrinthus vestibularis) bilden das Innenohr.

#### 2.1.1 Äußeres Ohr und Mittelohr

Zur Auris externa gehören die Ohrmuschel (Auricula), der äußere Gehörgang (Meatus acusticus externus) und das Trommelfell (Membrana tympani), welches die Grenze zwischen Auris externa und Auris media bildet.

Die Auris media liegt im Inneren des Os temporale und besteht aus lufthaltigen Räumen, die mit Schleimhaut ausgekleidet sind. Die Paukenhöhle (Cavitas tympanica) mit den drei Gehörknöchelchen (Ossicula auditoria) liegt zwischen dem Trommelfell und dem Innenohr. Nach vorn steht die Cavitas tympanica mit dem Pharynx durch die Ohrtrumpete (Tuba auditiva, Eustachi-Röhre) und nach hinten mit den pneumatischen Räumen des Processus mastoideus des Os temporale in Verbindung. In Abbildung 1 sind die anatomischen Strukturen des Ohres und deren Lage zueinander orientierend dargestellt.

Die von sechs Wänden umschlossene Paukenhöhle lässt sich von oben nach unten in drei ineinander übergehende Etagen (Epitympanon, Mesotympanon, Hypotympanon) unterteilen. Das Epitympanon liegt oberhalb des Trommelfells. Sein Dach (Paries tegmentalis) wird durch eine dünne Knochenplatte (Tegmen tympani) gebildet, die die Paukenhöhle von der mittleren Schädelgrube trennt. Das Mesotympanon liegt in Höhe des Trommelfells. In diesem Bereich liegen die vier Seitenwände der Paukenhöhle (Paries caroticus, Paries mastoideus, Paries membranaceus und Paries labyrinthicus). In der Paries labyrinthicus liegt eine flache Erhebung (Promotorium), die durch die Ausdehnung der basalen Schneckenwindung

verursacht wird. Hinter und oberhalb des Promotoriums befindet sich das ovale Fenster (Fenestra vestibuli), welches die Steigbügelplatte aufnimmt. Hinter und unterhalb des Promotoriums liegt das runde Fenster (Fenestra cochleae), welches durch die Rundfenstermembran (Membrana tympani secundaria) verschlossen ist. Kaudal vom Trommelfell liegt das Hypotympanon, dessen untere Begrenzung vom Paukenhöhlenboden (Parietis jugularis) gebildet wird [29].

Die drei Gehörknöchelchen Hammer (Malleus), Amboss (Incus) und Steigbügel (Stapes) sind im Epi- und Mesotympanon der Paukenhöhle lokalisiert und bilden eine knöcherne, gelenkig verbundene Kette. Sie übertragen und verstärken mechanische Schwingungen des Trommelfells, mit dem der Hammer fest verbunden ist, über das ovale Fenster, in das die Steigbügelplatte (Basis stapedis) eingelassen ist, auf die Perilymphe des Innenohres.

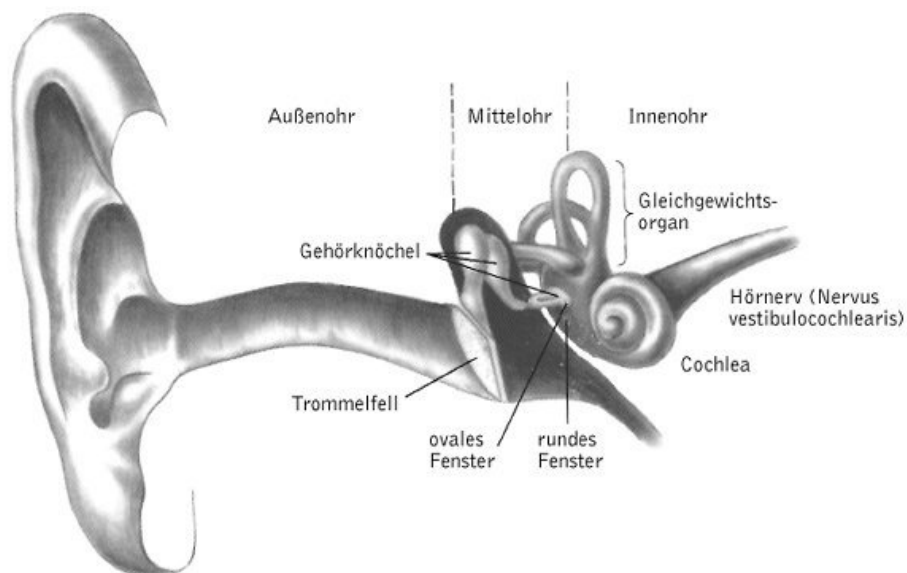


Abbildung 1: Schematische Darstellung der anatomischen Strukturen des Ohres [30]

## 2.1.2 Innenohr

Das Innenohr (Auris interna, Labyrinth) besteht aus miteinander verbundenen Kanälen und Hohlräumen, die sich im Felsenbein (Pars petrosa des Os temporale) befinden.

Zu unterscheiden ist das häutige Labyrinth, welches mit Endolymphe gefüllt ist und sowohl das Hör- als auch das Gleichgewichtsorgan beherbergt, vom knöchernen Labyrinth, welches schützend das häutige Labyrinth umschließt.

### 2.1.2.1 Knöchernes Labyrinth

Das knöcherne Labyrinth (Labyrinthus osseum), welches größer als das häutige ist, folgt dessen Form. Auf diese Weise bleiben zwischen beiden Labyrinth zu Teil weite, mit Perilymphe gefüllte Hohlräume ausgespart (Spatium perilymphaticum). Perilymphe ist eine

wässrige Flüssigkeit mit einer Elektrolytzusammensetzung, die weitgehend der allgemeinen interstitiellen Flüssigkeit entspricht, das heißt, eine hohe Natrium- und geringe Kaliumkonzentration ( $c_{\text{Na}} = 140 \text{ mM}$ ;  $c_{\text{K}} = 4 \text{ mM}$ ) aufweist.

Zentraler Raum des knöchernen Labyrinthes ist der Vorhof (Vestibulum). Er steht auf der hinteren Seite mit den knöchernen Bogengängen (Canales semicirculares) und auf der vorderen Seite mit der gewundenen Schnecke (Cochlea) in Verbindung. Die laterale Wand des Vorhofes grenzt an die Paukenhöhle und beinhaltet das ovale und runde Fenster.

Der beim Menschen ca. 35 mm lange knöcherne Schneckenkanal (Canalis spiralis cochleae) windet sich 2,5-mal gegen den Uhrzeigersinn um eine konische Achse aus spongiösem Knochen (Modiolus), bis er die Schneckenkuppel (Cupula cochleae) erreicht. Im Modiolus verlaufen die Pars cochlearis des N. vestibulocochlearis sowie Blutgefäße. Außerdem liegt in diesem Bereich das Ganglion spirale. Im Canalis spiralis cochleae verlaufen die beiden mit Perilymphe gefüllten Scala vestibuli und Scala tympani sowie der mit Endolymphe gefüllte Ductus cochlearis (Scala media). An der Schneckenspitze steht die Perilymphe der Scala vestibuli über das Schneckenloch (Helicotrema) mit der Perilymphe der Scala tympani in Verbindung. Die Scala tympani endet ihrerseits an der Rundfenstermembran (Membrana tympani secundaria), die die Fenestra cochleae zur Paukenhöhle hin verschließt [29].

### 2.1.2.2 Häutiges Labyrinth

Das häutige Labyrinth (Labyrinthus membranaceus) bildet ein in sich geschlossenes System von Kanälen und Säckchen, welches mit epitheliale Gewebe ausgekleidet und mit Endolymphe gefüllt ist. Die Endolymphe ist in ihrer Elektrolytzusammensetzung mit der intrazellulären Flüssigkeit vergleichbar. Mit einer hohen Kalium- und einer niedrigen Natriumkonzentration ( $c_{\text{Na}} = 1 \text{ mM}$ ;  $c_{\text{K}} = 120 \text{ mM}$ ) ist das Ionenverhältnis somit umgekehrt zur Perilymphe. Die Endolymphe wird von Zellen der Stria vascularis des Ductus cochlearis und lokal vom Sinnesepithel des Vestibularorgans gebildet [31].

Die spezialisierten Rezeptorepithelien von Gleichgewichts- und Hörorgan befinden sich an räumlich voneinander getrennten Stellen innerhalb des häutigen Labyrinths.

Der Ductus cochlearis ist der Teil des häutigen Labyrinths, der das Hörorgan beinhaltet. Er endet blind in der Schneckenspitze als Caecum vestibulare. Über den Ductus reuniens steht er mit dem restlichen Endolymphsystem in Verbindung. Der in seinem Querschnitt dreiseitig konfigurierte Ductus cochlearis bildet die Scala media des Canalis spiralis cochleae und wird beidseits von den Perilymphräumen der Scala vestibuli und Scala tympani begrenzt (siehe Abbildung 2a).

Die Grenze zur Scala vestibuli bildet die Reissner-Membran (Membrana vestibuli). Sie erstreckt sich zwischen dem Oberrand der Lamina spiralis ossea bis zum Ligamentum

spirale. Die Membrana vestibuli besteht aus einer dünnen Bindegewebsschicht mit nur einer Basalmembran, die zur Scala media hin von einem einschichtigen Plattenepithel und zur Scala vestibuli hin von Mesothel bedeckt ist. Die Zellen der Reissner-Membran bilden durch dichte Zell-Zell-Verbindungen (Tight junctions) eine undurchlässige Schicht, was die Durchmischung von Perilymphe und Endolymphe verhindert.

Durch die Basilarmembran (Lamina basilaris, Membrana spiralis) erfolgt die Abgrenzung zur Scala tympani. Sie ist zwischen dem Unterrand der Lamina spiralis ossea und dem Ligamentum spirale ausgespannt. Auf ihrer Oberseite trägt sie das Corti-Organ (Organum spirale cochleae) – den Schallaufnahmeapparat des Hörorgans. Grundlage dieser Membran sind starre, fächerförmig nach außen verlaufende Bindegewebsfasern, die vor allem in radialer Richtung Formsteifigkeit gewährleisten. Auf der perilymphatischen Fläche der Basilarmembran befindet sich die tympanale Belegschicht, die aus einer Lage mesothelialer Zellen besteht, welche nach medial den Modiolus und nach lateral das Ligamentum spirale und den Boden der Scala tympani überziehen [32].

Die laterale Wand des Ductus cochlearis besteht aus einem mit dem Periost verbundenen Bindegewebspolster, dem Ligamentum spirale cochleae, welches dem knöchernen Labyrinth anliegt. Auf seiner endolymphatischen Fläche ist das Ligamentum spirale von einem mehrschichtigen Epithel (Stria vascularis) bedeckt, welches von einem dichten Kapillarnetzwerk umgeben ist und aus drei Zelltypen besteht. Diese Marginal-, Intermediär- und Basalzellen gehen untereinander dichte Zell-Zell-Verbindungen ein, wodurch ein abgeschlossener Raum (intrastriales Kompartiment) entsteht. Die stoffwechselaktiven Marginalzellen sind für die Produktion der kaliumreichen Endolymphe verantwortlich.

Die mediale Kante des Ductus cochlearis ist an der Lamina spiralis ossea befestigt, die vom Modiolus entspringt und sich wie ein Schraubengewinde durch die ganze Schnecke zieht. Sie besteht aus zwei parallelen Lamellen. Zwischen diesen Blättern finden sich senkrechte, plattenförmige Knochenstege, die zwischen sich Kanäle (Habenula perforata) für den Durchtritt von Gefäßen und Nervenfasern freilassen.

### **2.1.2.3 Corti-Organ (Organum spirale cochleae)**

Auf der Basilarmembran liegt als Epithelwulst ein hochprismatisches Sinnesepithel, das als Organum spirale cochleae bezeichnet wird. Es läuft auf der ganzen Länge des Ductus cochlearis spiralg um den Modiolus herum und besteht wie jedes Neuroepithel aus Stütz- und Sinneszellen. Überdeckt wird das Organum spirale durch die Tektorialmembran (Membrana tectoria). Medial (Sulcus spiralis internus) und lateral (Sulcus spiralis externus) des Corti-Organ ist das Epithel flach (siehe Abbildung 2b).

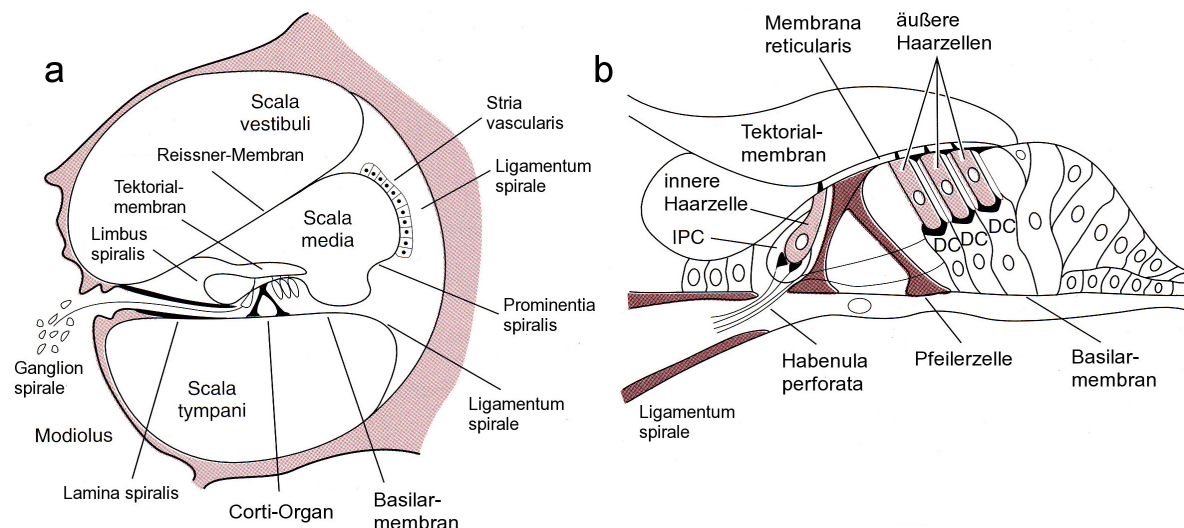


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Canalis spiralis cochleae (a) und des Corti-Organ (b; IPC = Innere Phalangenzelle, DC = Deiters-Zelle) [33]

Sämtliche Stützzellen sind durch ein ausgeprägtes Zytoskelett aus Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Aktin (Mikrofilamente) gekennzeichnet. Bei ihnen sind in der Reihenfolge des Vorkommens von medial nach lateral innere Phalangenzellen, innere und äußere Pfeilerzellen, äußere Phalangenzellen (Deiters-Zellen), Hensen-Zellen und Claudius-Zellen zu unterscheiden.

Die inneren Phalangenzellen liegen in einer einzelnen Reihe und tragen die inneren Haarzellen, die sie kelchförmig umfassen. Innere und äußere Pfeilerzellen stehen ebenfalls in je einer Zellreihe. Sie sind durch ihr stark entwickeltes Zytoskelett sehr starr und mit ihren apikalen Abschnitten gegeneinander geneigt. Die zytoskelettreichen äußeren Phalangenzellen tragen die äußeren Haarzellen und sind in 3, in der Spitzenwindung der Cochlea in 4 – 5 Reihen angeordnet. Sie bestehen aus einem breiten Abschnitt, der auf der Basilar-membran sitzt, und einem fingerförmigen Fortsatz, der in eine abgeflachte Phalangenplatte übergeht, welche am Aufbau der Membrana reticularis beteiligt ist.

Innere und Äußere Haarzellen sind die Sinneszellen des Corti-Organ. Gemeinsam ist ihnen, dass sie keine direkte Verbindung mit der Basilar-membran haben, sondern von den Phalangenzellen getragen werden. Apikal sind die Haarzellen mit 50 – 120 Sinneshaaren (Stereozilien) versehen, die jeweils zur lateralen Zellseite hin größer werden und durch feine Plasmamembranbrücken (Tip-links) miteinander verbunden sind. Die Stereozilien sind 200 nm dicke Mikrovilli unterschiedlicher Länge. Das Binnenskelett aus Aktinfilamenten, welches durch Aktin-bindende Proteine quervernetzt ist, verleiht ihnen Steifigkeit. Dieses Stereozilienskelett ist in einer Kutikularplatte verwurzelt.

Die birnenförmigen, von den inneren Phalangenzellen getragenen inneren Haarzellen sind die eigentlichen Schallsensoren und bilden entlang dem Corti-Organ eine Zellreihe aus insgesamt ca. 3500 Zellen. Die hochprismatischen äußeren Haarzellen sind kontraktile und

fungieren als cochleäre Verstärkerelemente. Sie ruhen mit ihrer Basis in der Auskehlung der äußeren Phalangenzellen und stehen wie diese in 3 (basale Schneckenwindung) bzw. 4 – 5 (apikale Schneckenwindung) Reihen nebeneinander. Pro Ohr kommen insgesamt ca. 12000 äußere Haarzellen vor [31].

Medial der inneren Phalangenzellen verliert das Epithel rasch an Höhe und kleidet den Sulcus spiralis internus aus. Dieser grenzt an den Limbus spiralis – einer von Epithel bedeckten Bindegewebslage auf der Lamina spiralis ossea. Die Epithelzellen dieser Region, Interdentalzellen genannt, sezernieren die Tektorialmembran (Membrana tectoria), welche an der Lippe (Labium) des Limbus spiralis verankert ist und das Corti-Organ in seinem ganzen Verlauf bedeckt. Die Membrana tectoria ist eine zellfreie glycosaminoglykanreiche Masse, in die mikrofibrilläre Strukturen eingebettet sind. Die längsten Stereozilien der äußeren Haarzellen ragen in diese gallertige Substanz hinein, wohingegen die Stereozilien der inneren Haarzellen frei im schmalen Endolymphraum unterhalb der Tektorialmembran enden.

Auf seiner ganzen Länge ist das Corti-Organ von kommunizierenden Spalträumen durchzogen (Corti-Kanal, Nuel-Raum und äußerer Tunnel). Diese Spalträume sind mit Corti-Lymphe gefüllt, die in ihrer Zusammensetzung in etwa der der Perilymphe entspricht. Corti-Lymphe und Perilymphe sind durch die Basilarmembran voneinander getrennt, welche jedoch keine Diffusionsbarriere darstellt. Die Abgrenzung gegenüber der Endolymph des Ductus cochlearis wird dadurch ermöglicht, dass apikal alle Zellen des Corti-Organ durch Desmosomen und Tight junctions fest aneinander haften. Durch diese Verknüpfung entsteht ein Bereich, der als Membrana reticularis bezeichnet wird und durch die Zusammenlagerung der Stützzellkopfplatten dem Corti-Organ Widerstandsfähigkeit verleiht und als Diffusionsbarriere fungiert. Lediglich die Apices der Sinneszellen überragen mit ihren Stereozilien diese Membran und werden somit der Endolymph ausgesetzt. Die basolaterale Membran der Haarzellen wird hingegen von Corti-Lymphe umspült. Dieser Sachverhalt ist für die mechanoelektrische Transduktion von entscheidender Bedeutung [34].

Die Innervation der Haarzellen ist sowohl afferent als auch efferent. Im Ganglion spirale cochleae liegen die Perikaryen der ersten Neurone der Hörbahn (afferente Innervation). Deren periphere (dendritische) Fortsätze ziehen durch die hohle Lamina spiralis ossea in Richtung Corti-Organ, wo sie kurz vor ihrem Durchtritt durch die Basilarmembran ihre Myelinscheide verlieren. 95% dieser afferenten Fasern enden an den inneren und nur 5% an den äußeren Haarzellen. Die Axone der bipolaren Neurone des Ganglion spirale vereinigen sich zur Pars cochlearis des N. vestibulocochlearis und ziehen durch den inneren Gehörgang (Meatus acusticus internus) zum Rautenhirn, wo sie in den Nuclei cochleares enden und auf die zweiten Neurone umgeschaltet werden. Die Efferenzen zum Corti-Organ



werden vom Tractus olivocochlearis gebildet, der vom Nucleus olivaris superior aus über den N. cochlearis zu den Haarzellen gelangt. Das Ganglion spirale enthält somit neben den Perikaryen der Afferenzen auch die Axone der efferenten Neuronen. Entsprechend ihrer Funktion sind vor allem die äußeren Haarzellen efferent innerviert [35].

## 2.2 Relevante antigene Strukturen

### 2.2.1 Basalmembranen – Kollagen Typ IV

Basalmembranen sind Bestandteil der extrazellulären Matrix und tragen in ihrer Gesamtheit durch die Verankerung von Zellen zur Ausbildung und Stabilisierung einer Organarchitektur bei. Des Weiteren beeinflussen sie die molekulare Stoffverteilung zwischen Interzellularsubstanz und den mit ihnen verbundenen Zellen und damit deren Wachstum, Regeneration und Differenzierung. Basalmembranen sind bis zu 1 µm dick und stellen sich durchlichtmikroskopisch als Trennlinie dar, die alle Epithelien, Endothelien und Gliazellverbände gegenüber dem bindegewebigen Stroma abgrenzt. Fett- und Muskelzellen besitzen eine Basalmembran, von der sie allseitig umhüllt werden, wohingegen beweglichen Zellen (z.B.: Blutzellen, Spermatozoen, Fibroblasten) eine derartige Umhüllung nicht aufweisen [32].

Elektronenmikroskopisch stellen sich Basalmembranen mehrschichtig dar. In der Reihenfolge ihres Vorkommens von der Zellschicht ausgehend, bestehen sie bei Epithelien aus der Lamina rara externa, der Lamina densa, der Lamina rara interna und der Lamina fibroreticularis.

Die Lamina rara externa (Lamina lucida) ist die dem Epithel zugewandte Basalmembranschicht. Ihr charakteristischster Bestandteil ist das basalmembranspezifische Glykoprotein Laminin. Es bindet einerseits an Lamininrezeptoren (Integrine) der Plasmamembran und andererseits an Strukturelemente der Lamina densa (v.a. an Kollagen Typ IV über das Protein Nidogen). Folglich vermittelt Laminin – wie auch andere Glykoproteine der Basalmembran – die Adhäsion der Zellen an ihre Umgebung.

Die 20–100 nm dicke Lamina densa (Basallamina) ist elektronenmikroskopisch sehr dicht. Sie besteht aus einem dreidimensionalen Netz aus Proteoglykanen und Kollagen Typ IV. Die Proteoglykane haben lange Glykosaminoglykanseitenketten (v.a. Heperansulfat), durch deren negative Ladungsausstattung die Basalmembran als Diffusionsbarriere für negativ geladene Makromoleküle dienen kann [36].

Kollagen Typ IV ist das charakteristische Strukturelement der Lamina densa. Wie bei allen Kollagenmolekülen ist das zentrale Bauelement die Tripelhelix, in der sich drei helikale Peptidketten ( $\alpha$ -Ketten) unter Bildung einer Superhelix umeinander winden. Diese räumliche Struktur erstreckt sich beim Kollagen Typ IV jedoch nicht wie bei den fibrillären Kollagenen

über das ganze Molekül, sondern wird durch nicht-helikale Zwischenstücke unterbrochen. Der Basallamina wird somit eine erhöhte Flexibilität und Elastizität verliehen. Durch die Ausbildung eines komplexen Netzwerkes mit Laminin und Proteoglykanen ist Kollagen Typ IV an der Regulierung der Filtrationsfunktion beteiligt.

Basallaminae treten auch als eigenständige Einheit an der Oberfläche vieler Zellen, wie z.B. Nerven- und Gliazellen, auf.

Die elektronenmikroskopisch nicht immer zweifelsfrei darstellbare Lamina rara interna besteht im Wesentlichen aus dem Adhäsionsprotein Fibronectin. Dieses hochmolekulare Glykoprotein verbindet durch seine Affinität zu verschiedensten Matrixsubstanzen und zur Zelloberfläche diese Strukturen miteinander.

Die Lamina fibroreticularis ist dicker als die übrigen Schichten. Sie besteht vor allem aus einem Geflecht dünner Kollagenfibrillen, vorwiegend Typ III, welche retikuläre Fasern bilden. Die Lamina fibroreticularis vermittelt dadurch die Verankerung der Basalmembran in der aus Kollagen Typ I bestehenden Lamina propria des Bindegewebes [32].

Somit stellen Kollagen Typ IV, Laminin und Heperansulfatproteoglykan (HSPG) die charakteristischen Hauptkomponenten der Basalmembran dar. Dies konnte in verschiedenen Studien auch für die cochleären Basalmembranen bestätigt werden [37, 38, 39, 40].

Die klinische Relevanz von Kollagen Typ IV wird v.a. im Rahmen hereditärer Erkrankungen, die mit einer Fehlbildung des Kollagenmoleküls einhergehen, deutlich. So führt beispielsweise eine Mutation des COL4A5-Gens (kodiert die  $\alpha 5$ -Kette des Kollagen Typ IV) beim Alport-Syndrom u.a. zu einer Anomalie der cochleären Basalmembran, welche in einer möglichen Innenohrschwerhörigkeit resultiert [41].

*Takahashi und Hokunan* [38] zeigten in ihrer immunhistochemischen Studie an Innenohren von Meerschweinchen, dass Kollagen Typ IV und Laminin in epithelialen, vaskulären und perineuralen Basalmembranen lokalisierbar sind. Die stärkste Anfärbbarkeit mit entsprechenden Antikörpern ließ sich in den Basalmembranen der Kapillargefäße der Stria vascularis und der Prominentia spiralis sowie in den Basalmembranen, welche Spiralganglionzellen und Schwann-Zellen (Gliazellen) umhüllen, nachweisen.

Bei der Untersuchung muriner Cochleae durch *Sato et al.* [39] wurden die Erkenntnisse bezüglich der Verteilung von Basalmembrankomponenten vertieft und erweitert. Mittels Immunfluoreszenz konnten Kollagen Typ IV, Laminin und Heperansulfatproteoglykan (HSPG) in nahezu allen vaskulären (Blutgefäße der Stria vascularis, des Ligamentum spirale, der Prominentia spiralis und des Limbus spiralis) und den die Scala media umgebende Basalmembranen dargestellt werden.

### 2.2.2 Gap junctions – Connexin 26

Gap junctions (Nexus) sind scharf begrenzte plaqueartige Bereiche an der Oberfläche korrespondierender Zellen, die diese sowohl mechanisch als auch funktionell miteinander verbinden. Eine Gap junction besteht aus mehreren hundert Gap-junction-Kanälen, welche wiederum aus je zwei Halbkanälen, sog. Connexonen zusammengesetzt sind. Ein Connexon ist eine transmembranöse, zylindrische Pore, die aus sechs Proteinuntereinheiten (Connexinen) in hexagonaler Anordnung besteht und eine Länge von 7,5 nm besitzt. Ein 2 nm langes Segment ragt in den Extrazellulärraum, wo es sich mit einem Connexon der Nachbarzelle verbindet. Der somit entstehende Kanal vermindert zum einen den Abstand der sich gegenüberliegenden Zellmembranen auf 2 – 4 nm und verbindet zum anderen die zytoplasmatischen Kompartimente beider Zellen miteinander. Durch einen solchen Kanal können kleine wasserlösliche Moleküle (i.d.R. bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa) sowie Ionen die Zelle wechseln, womit eine metabolische, chemische (via second messenger, z.B.  $\text{IP}_3$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) und elektrische Zellkopplung gewährleistet wird [32, 36].

Diese interzelluläre Kommunikation spielt auch für den Hörvorgang eine entscheidende Rolle. In vielen histologischen und elektronenmikroskopischen Studien konnte daher das ausgeprägte Vorkommen von Gap junctions in der Cochlea nachgewiesen werden [42, 43, 44]. Von den mehr als 20 verschiedenen, für Connexin kodierenden Genen und deren entsprechende Isoformen [45], sind zwei Isoformen in der Cochlea besonders exprimiert: Connexin 26 (Cx26) und Connexin 30 (Cx30) [46, 47]. Anhand von genetischen Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass nahezu die Hälfte der Fälle von hereditärer, nicht-syndromalen Taubheit durch Mutationen des Cx26- und Cx30-Gens bedingt sind [48, 49, 47, 50].

*Kikuchi et al.* [46] haben mit Hilfe von immunhistochemischen und ultrastrukturellen Analysen muriner Cochleae zwei voneinander unabhängige Gap-junction-Netzwerke identifiziert: eines zwischen den Stützzellen des Corti-Organs (epitheliales Netzwerk) sowie ein anderes zwischen den Zellen des Bindegewebes der lateralen cochleären Wand (bindegewebiges Netzwerk).

Im epithelialen Gap-junction-Netzwerk werden sowohl Cx26 als auch Cx30 zellspezifisch exprimiert. In der Arbeit von *Zhao und Yu* [47] wurde mittels Doppelimmunfluoreszenz Cx26 v.a. im Bereich der Hensenzellen und Cx30 im Bereich der Deiters- und Pfeilerzellen nachgewiesen. Funktionelle Untersuchungen haben des Weiteren ergeben, dass cochleäre Gap junctions variierende Permeabilität und Ladungsselektivität aufweisen. Die Arbeitsgruppe um *Zhao* zeigte in ihren Studien, dass Cx26 im Wesentlichen für die Permeation von Anionen verantwortlich ist und eine entscheidende Rolle bei der interzellulären Signaltransduktion spielt [51, 52]. Cx30 wird hingegen für die Permeation von

Kationen verantwortlich gemacht [47]. Die Gap junctions des epithelialen Netzwerkes spielen demnach eine entscheidende Rolle für den Rücktransport der während der Signaltransduktion permeierten Ionen, wodurch die Sensitivität der sensorischen Zellen des Corti-Organes aufrechterhalten werden kann [53].

Das bindegewebige Gap-junction-Netzwerk der lateralen cochleären Wand, welche in erster Linie das Ligamentum spirale und die Stria vascularis umfasst, ist entscheidend für die Aufrechterhaltung des positiven endocochleären Potentials und die Generierung einer hohen endolymphatischen Kaliumkonzentration. Die mittels Immunfluoreszenz gewonnenen Daten zur zellspezifische Verteilung von Cx26 und Cx30 innerhalb dieses Netzwerkes, werden ausführlich in der Arbeit von *Liu und Zhao* beschrieben [54].

Die Tabelle 1 gibt nach Analyse der Studienergebnisse zur Expression der cochleären Connexine [47, 54] einen zusammenfassenden Überblick über die Verteilung von Cx26.

Tabelle 1: Cochleäre Expression von Connexin 26 (Cx26)

	Cx26 exprimiert in	Cx26 nicht exprimiert in
<b>Epitheliales Gap-junction-Netzwerk</b>		
	Pfeilerzellen	Innere Haarzellen
	Deiterszellen	Außere Haarzellen
	Hensenzellen	
	Claudiuszellen	
<b>Bindegewebiges Gap-junction-Netzwerk</b>		
Stria vascularis	Basalzellen	Marginalzellen
	Intermediärzellen	
Ligamentum spirale und Sulcus lateralis	Fibrozyten Typ V	Fibrozyten Typ IV
	Fibrozyten Typ II	Fibrozyten Typ III
	Epithelzellen des Sulcus latrealis	

## 2.3 Physiologie des Hörvorgangs

Das Hörvermögen bezeichnet die Fähigkeit des Gehörorgans zur Aufnahme, Wahrnehmung und Verarbeitung akustischer Reize [3].

Der adäquate Stimulus für das Gehör ist der Schall. Als Schallwellen werden Molekülschwingungen elastischer Stoffe bezeichnet, die sich als Dichte- bzw. Druckschwankungen wellenförmig ausbreiten [31]. Die dabei entstehende Druckamplitude nennt man Schalldruck und dessen logarithmisches Maß Schalldruckpegel, welcher in

Dezibel (dB) angegeben wird. Ein Ton ist eine Sinusschwingung, welche nur aus einer einzigen Frequenz besteht. Je höher die Schallfrequenz, desto höher wird der Ton subjektiv wahrgenommen. Die frequenzabhängige Hörschwelle beschreibt den minimalen Schalldruckpegel, der zur Wahrnehmung eines Tones notwendig ist. Am empfindlichsten ist das Ohr für Schallfrequenzen zwischen 2000 und 5000 Hz, wo die Hörschwelle am niedrigsten ist. Zu höheren und niedrigeren Frequenzen hin nimmt der Schalldruckpegel, den man für eine Tonwahrnehmung benötigt, zu. Wegen dieser Gesetzmäßigkeit hat man zur Beschreibung der subjektiven Lautheitsempfindung als weiteres Maß den Lautstärkepegel (angegeben in Phon) eingeführt. Der Phonskala können verschiedene Isophone entnommen werden. Eine Isophone entspricht der Menge aller Töne, die bei unterschiedlichen Schalldruckpegeln in unterschiedlichen Frequenzbereichen subjektiv als gleich laut empfunden werden. Die niedrigste Isophone entspricht der Hörschwelle. Der menschliche Hörbereich liegt bei einer Schallfrequenz zwischen 20 und 16000 Hz und bei einem Lautstärkepegel zwischen 4 und 130 Phon. Innerhalb dieses Wahrnehmungsbereiches liegt der Hauptsprachbereich (300 – 3000 Hz und 40 – 80 Phon) [55].

Das in Schwingung versetzte Trommelfell überträgt die Schallenergie auf die Gehörknöchelchen (Hammer, Amboss und Steigbügel). Durch die daraus resultierende Bewegung der Bodenplatte des Steigbügels wird die Schallenergie auf das ovale Fenster übertragen. Die wichtigste Funktion dieser Schallweiterleitung im Mittelohr ist die Impedanzwandlung zwischen dem luftgefüllten äußeren Ohr und dem flüssigkeitsgefüllten Innenohr. Durch die Hebelwirkung der Gehörknöchelkette und die Verkleinerung der wirksamen Fläche (Trommelfellfläche : Steigbügel Fußplattenfläche = 20 : 1) wird der für die Impedanzanpassung nötige Schalldruck erhöht, und die auf das Innenohr übertragene Schallenergie auf das dreißigfache vergrößert [31, 56].

Die Schalldruckeinwirkung am ovalen Fenster bewirkt eine Volumenverschiebung der Perilymphe in der Scala vestibuli. Das Ausschlagen der Perilymphe wird durch die elastische Rundfenstermembran (Membrana tympani secundaria) ermöglicht. Dadurch entsteht eine Welle, die sich in Richtung Helicotrema ausbreitet (Wanderwellentheorie). Als Folge dessen werden die Wände der endolymphgefüllten Scala media (cochleäre Trennwand) deformiert. Die Steifigkeit der Basilarmembran nimmt apikalwärts ab, wohingegen die elastischen Rückstellkräfte zunehmen. Diese Eigenschaften bewirken eine Abnahme der Wellenlänge und eine Zunahme der Amplitude bis zu einem Maximum der passiven Bewegungsauslenkung. Dieses Maximum ist für jede Tonfrequenz an einem spezifischen Ort in Längsrichtung der cochleären Trennwand lokalisiert (Ortstheorie, Tonotopie). Je geringer die Frequenz ist, desto apexnäher liegt das Amplitudenmaximum der passiven Wanderwelle. Ein kompliziertes, aus mehreren Tonhöhen bestehendes

Schallereignis wird dadurch längs der Basilarmembran aufgespreizt (Frequenzdispersion). Durch die sich anschließende aktive Schallverarbeitung wird die flache und breite passive Wanderwelle in eine Welle mit hohen und scharfen Maxima umgeformt, was die Frequenzselektivität und Empfindlichkeit des auditorischen Systems erhöht [55].

Die zelluläre Grundlage dieses cochleären Verstärkermechanismus sind die äußeren Haarzellen, deren längste Stereozilien mit der Tektorialmembran in Verbindung stehen. Bei den Schwingungen der cochleären Trennwand scheren diese Zilien, welche an ihren Spitzen über Tip-links verbunden sind, durch die Relativbewegung zwischen Basilarmembran und Tektorialmembran aus. Je nach Spannung der Tip-links werden Ionenkanäle in der apikalen Membran der Stereozilien geöffnet (Abscherung der Zilien; gespannte Tip-links) oder geschlossen (Zurücklenkung der Zilien; entspannte Tip-links). Bei Öffnung dieser Transduktionskanäle strömen überwiegend Kaliumionen entlang der elektrochemischen Potenzialdifferenz (extrazelluläres Ruhepotential des Endolymphraumes: +85 mV; zytoplasmatisches Ruhepotential der äußeren Haarzelle: -70 mV) ins Zellinnere. Dies führt zum Einstrom weiterer positiver Ladungen; beispielsweise in Form von Calciumionen, die in den Haarzellen als Second messenger agieren. Das durch die entstandene Depolarisation gebildete Rezeptorpotential ist proportional zur Zilienauslenkung. Die Repolarisation erfolgt durch Öffnung von Kationenkanälen in der Basolateralmembran der Haarzellen, über die Kaliumionen in die Perilymphe der Scala tympani strömen. Die für den Kreislauf von Kaliumionen notwendige Energie wird nicht durch die Haarzelle selbst, sondern durch das elektrochemische Potenzial der Endolymph und damit durch die Stria vascularis erzeugt. Die periodischen Erregungen der äußeren Haarzellen resultieren in oszillierenden Längenänderungen ihres Zelleibes. Durch diesen aktiven Prozess verstärken und verschärfen sie die Wanderwelle. Dieser cochleäre Verstärker ermöglicht so den inneren Haarzellen auch bei sehr schwachen akustischen Reizen sowie frequenzselektiv sensorisch wirksam zu sein [57].

Durch die Erregung der inneren Haarzellen erfolgt die mechanochemische bzw. mechanoelektrische Transduktion dieses modifizierten mechanischen Signals.

Während die Deflexion der Stereozilien der äußeren Haarzellen durch die direkte Kopplung mit der Tektorialmembran erfolgt, gehen Modelle für die inneren Haarzellen davon aus, dass der Strömungswiderstand der Flüssigkeit im Subtektorialraum die Zilien der inneren Haarzellen mitreißt (hydraulische Kopplung [58]). Wie bei den äußeren Haarzellen führt die Ziliendeflexion zur Öffnung apikaler Kationenkanäle, was den Einstrom von Kaliumionen entlang dem Potenzialgefälle (extrazelluläres Ruhepotential des Endolymphraumes: +85 mV; zytoplasmatisches Ruhepotential der inneren Haarzelle: -40 mV) ins Zellinnere nach sich zieht. Die Depolarisation mit der Generierung eines Rezeptorpotenzials und die Repolarisation der inneren Haarzellen laufen daraufhin wie bei den äußeren Haarzellen ab.

Abweichend resultieren eine Depolarisation und der intrazelluläre Konzentrationsanstieg von Calciumionen nicht in einer Änderung der Zellkörperlänge, sondern in einer Freisetzung afferenter Neurotransmitter am basalen Pol der inneren Haarzellen. Die Transmitter diffundieren durch den schmalen synaptischen Spalt und binden an korrespondierende postsynaptische Rezeptoren. Dadurch wird die afferente Nervenzellmembran depolarisiert und ein postsynaptisches Potenzial (Generatorpotenzial) erzeugt. Bei Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes – was nur durch Summation mehrerer exzitatorischer Generatorpotenziale möglich ist – wird ein Aktionspotenzial in den zugeordneten Nervenfasern ausgelöst („Alles-oder-Nichts-Gesetz“).

Die Zeitdauer eines Schallreizes wird durch die Zeitdauer der Aktivierung der Nervenfasern verschlüsselt. Die Höhe des Schalldruckpegels wird durch die Entladungsrate der Aktionspotenziale kodiert. Eine einzelne Nervenfaser kann jedoch eine bestimmte Entladungsrate nicht überschreiten, sondern erreicht ab einem bestimmten Schalldruck einen Sättigungsbereich [59]. Erst durch die zunehmende Aktivierung benachbarter Fasern (Rekrutierung) kann die Information noch höherer Lautstärken weitergegeben werden.

Jede innere Haarzelle ist nach dem Ortsprinzip (Tonotopie) einer ganz bestimmten Tonfrequenz zugeordnet. Die mit einer bestimmten inneren Haarzelle synaptisch verbundene Hörnervenfasern werden bei dieser charakteristischen Frequenz (Bestfrequenz) optimal erregt. Bei komplexen Schallreizen sind jedoch bei mittleren Schalldruckpegeln fast alle Fasern des Hörnervs unabhängig von ihrer Bestfrequenz im Sättigungsbereich. Das Gehirn muss daher die Informationszusammensetzung eines Schallreizes zusätzlich auf andere Weise extrahieren. Deshalb wird neben der Ortskodierung auch das zeitliche Muster der Aktionspotenziale in den erregten Fasern analysiert, um Rückschlüsse auf die Tonhöhe zu ziehen. Die als Folge des Schallsignals sich hin und her bewegendes Stereozilium löst nur bei Auslenkung in Richtung zum längsten Stereozilium hin (Positivphase des Schalls) eine Depolarisation, Transmitterfreisetzung und Aktionspotenzialgenerierung aus, während in Gegenrichtung eine Re- oder sogar Hyperpolarisation erfolgt. Eine Einzelentladung entspricht also der ursprünglichen Positivphase des Schalls (Phasenkopplung von Schall und Aktionspotenzial). Die Entladungsraten der Nervenaktionspotenziale spiegeln daher das Zeitmuster des Schallsignals wider (Periodizitätsanalyse), welches mit der Frequenz des Schalls übereinstimmt. Dieser Mechanismus funktioniert allerdings nur bis zu einer Frequenz von 5 kHz [60]. Die Periodizitätsanalyse wird von Cochlear-Implantaten genutzt, da somit trotz Reizung an nur einem Ort ein gewisser Frequenzumfang übertragen werden kann.

Die nach Frequenzen geordneten Fasern des N. vestibulocochlearis ziehen zu den Nuclei cochlearis der Medulla oblongata und dann weiter zu den ipsi- und kontralateral gelegenen

Nuclei olivares superiores. Nach dieser Verschaltung verlaufen die Fasern im Lemniscus lateralis der Gegenseite zu höheren Kerngebieten. Die sensorischen Neuronen der Hörbahn führen schließlich zum Corpus geniculatum mediale des Thalamus, von wo aus die kortikalen Projektionsfelder der Hörrinde innerviert werden. Somit werden von den Sinneszellen bis zum auditorischen Kortex die Informationen des Schallsignals über wenigstens 5 – 6 untereinander verschaltete Neuronen weitergeleitet. Von Instanz zu Instanz werden bestimmte Charakteristika aus der akustischen Information herausgearbeitet, indem es immer mehr einer besonderen Eigenschaft des Schalls bedarf, um bestimmte Neurone zu erregen. So reagieren sie beispielsweise auf bestimmte Schallfrequenzen, bestimmte Frequenzänderungen oder bestimmte Amplituden mit Hemmung oder Erregung. Durch diese mehrfache Informationskodierung wird eine genaue Mustererkennung gewährleistet [57].

## 2.4 Ätiologie und Pathophysiologie der Schwerhörigkeit und Ertaubung

Menschen, bei denen der Gehörsinn nicht ausgebildet ist und folglich das Hörvermögen fehlt, leiden unter Gehörlosigkeit bzw. Taubheit. Taubheit ist laut *Schumacher et al.* [4] definiert als Hörverlust von mehr als 60 dB im Bereich zwischen 125 und 250 Hz sowie von mehr als 100 dB im übrigen Frequenzbereich. Ist das Hörvermögen noch erhalten, jedoch herabgesetzt, wird von Schwerhörigkeit gesprochen [2, 3]. Ätiologisch wird zwischen hereditärer und erworbener Schwerhörigkeit bzw. Taubheit differenziert [61].

In etwa 30% der hereditären Hörstörungen ist die Schwerhörigkeit mit anderen Symptomen vergesellschaftet. Laut *Probst et al.* [2] sind über 400 klinische Syndrome bekannt, die mit einer Schwerhörigkeit einhergehen können. Hierfür beispielhaft zu nennen sind das Usher-Syndrom, das Waardenburg-Syndrom, das Alport-Syndrom und die Trisomie 21 [4]. Bei ca. 70% der hereditären Hörstörungen ist nur das Gehör betroffen, so dass von monosymptomatischer bzw. nicht-syndromaler Schwerhörigkeit gesprochen wird. Laut *Schumacher et al.* [4] existieren schätzungsweise über 100 Gene, deren Mutation zu nicht-syndromaler hereditärer Schwerhörigkeit führt. 80% dieser Hörstörungen werden autosomal rezessiv vererbt. Dabei liegt in etwa 50% eine Mutation des GJB2-Gens vor, welches für das Gap junction Protein Connexin 26 kodiert [2].

Ursachen erworbener Schwerhörigkeit bzw. Taubheit können traumatischer, entzündlicher oder toxischer Natur sein. Nach dem Zeitpunkt der ursächlichen Schädigung wird zwischen prä-, peri- und postnatal erworbenen Hörstörungen unterschieden. In Tabelle 2 sind entsprechend einige Beispiele genannt.



Schwerhörigkeit kann des Weiteren unterteilt werden in Schallleitungs- und Schallempfindungsschwerhörigkeit.

Schallleitungsschwerhörigkeit entsteht infolge einer Störung der Schallübertragung im äußeren Ohr (z.B. durch Cerumen obturans), Mittelohr (z.B. bei Otitis media) oder am ovalen Fenster (z.B. bei Otosklerose) [3]. Eine Schallempfindungsschwerhörigkeit, welche auch als sensorineurale Schwerhörigkeit bezeichnet wird, resultiert aus Läsionen des Innenohres, des Hörnervs oder der zentralen Hörbahn. Ist das Corti-Organ geschädigt, beispielsweise infolge eines akustischen Traumas oder bei der Menière-Krankheit, wird von sensorischer Schwerhörigkeit gesprochen. Die neurale Schwerhörigkeit findet ihren Ursprung meist in Schäden des Hörnervs, welche in erster Linie durch Akustikusneurinome am Kleinhirnbrückenwinkel hervorgerufen werden. Degenerative, vaskuläre, neoplastische oder auch demyelinisierende Erkrankungen können ebenfalls zu einer neuralen Schwerhörigkeit führen, wenn sie die zentrale Hörbahn mit betreffen [2].

Tabelle 2: Ursachen erworbener Schwerhörigkeit [2, 4]

<b>Zeitpunkt der Schädigung</b>	<b>Einteilung</b>	<b>Beispiele</b>
Pränatal	infektiös	- Rötelnembryopathie - Toxoplasmose - Lues connata
	toxisch-medikamentös	- Alkoholembryopathie - Thalidomid
Perinatal	infektiös	- Zytomegalie-Virus - Herpes-simplex-Virus
	metabolisch	- Asphyxie - Kernikterus bei Hyperbilirubinämie
	geburtstraumatisch	- intrazerebrale und intracochleäre Blutung
Postnatal	infektiös	- Meningitis - Labyrinthitis - länger andauernde chronische Otitis media - Mumps, Masern
	toxisch-medikamentös	- Aminoglykosidantibiotika
	traumatisch	- Akustische Traumata - Felsenbeinfraktur

Obwohl bereits einige Fälle von Hörstörungen infolge Läsionen der zentralen Hörbahn beschrieben wurden [62], spielen laut *Nadol et al.* [63] die verschiedensten Formen möglicher Degenerationen des Innenohrs die entscheidende Rolle bei der Entstehung von Hörstörungen. Histopathologisch sind hier v.a. die äußeren Haarzellen, die Stria vascularis und das Ligamentum spirale sowie die afferenten und efferenten Nervenfasern der Pars cochlearis des N. vestibulocochlearis relevant [64, 65, 66].

Laut *Turner* [67] sind Läsionen an den Haarzellen die Hauptursache für sensorineurale Schwerhörigkeit. Die äußeren Haarzellen verstärken und verschärfen die Wanderwelle derart, dass die inneren Haarzellen auch bei schwachen akustischen Reizen sensorisch wirksam sind und eine scharfe Frequenzselektivität gewährleistet bleibt. Ein Funktionsverlust der äußeren Haarzellen führt demnach zu einem Sensitivitätsverlust des Gehörsinns für niedrig-amplitudige Schallreize. Außerdem verschlechtert sich infolge der mangelnden Frequenzselektivität bei betroffenen Patienten das Verstehen von Wörtern in geräuschvoller Umgebung. Sind die inneren Haarzellen in einem Bereich der Basilarmembran geschädigt, so kann nach dem Prinzip der Tonotopie der entsprechende Frequenzbereich nicht mehr wahrgenommen werden. Bei großem Verlust innerer Haarzellen ist ein Sprachverständnis demnach auch bei höher-amplitudigen Schallreizen nicht mehr möglich. Ein kompletter Funktionsverlust aller inneren Haarzellen resultiert in einer Taubheit [68].

Anhand von Tierexperimenten konnte des Weiteren gezeigt werden, dass ein Verlust von Haarzellen auch zu einer Degeneration peripherer nervaler Dendriten sowie einer Reduktion der Spiralganglienzahl führt [69]. *Nadol et al.* [70] konnten mit ihrer Studie an post-mortem Felsenbeinpräparaten von 66 Patienten, die während ihres Lebens unter ausgeprägter Schwerhörigkeit litten, zeigen, dass die Dauer der Hörstörung eine umgekehrte Korrelation zur Zahl noch vorhandener Spiralganglienzellen aufwies. Bei der Versorgung mit Cochlear-Implantaten (CI), welche durch elektrische Reizung der cochleären Spiralganglienzellen einen Höreindruck erzeugen, ist die Zahl der noch vorhandenen Ganglienzellen ein entscheidender Faktor für den Erfolg der Therapie [71]. Neurale Degeneration führt sowohl bei akustischer als auch bei elektrischer Stimulation zu einem reduziertem Sprachverständnis [72].

Die stoffwechselaktiven Marginalzellen der Stria vascularis sind für die Produktion der kaliumreichen Endolympe verantwortlich. Das dadurch generierte hohe positive endocochleäre Potential ist der Motor für den Kaliumkreislauf, welcher die De- und Repolarisation der Haarzellen ermöglicht. Eine Schädigung der Stria vascularis resultiert somit in einem Funktionsverlust der Haarzellen und folglich ebenfalls in einer Hörstörung [53].

## 2.5 Therapie mit Cochlear-Implantaten

Cochlear-Implantate (CI) sind implantierbare elektronische Hörprothesen, die durch direkte elektrische Reizung der Ganglienzellen im Ganglion spirale der Cochlea einen Höreindruck erzeugen [3]. Sie gelten als Standardtherapie bei irreversibler Taubheit oder hochgradiger Innenohrschwerhörigkeit im Kindes- und Erwachsenenalter, wenn eine Hörgeräteversorgung nur unzureichend ist. Eine CI-Versorgung kann unilateral (einseitig) oder bilateral (beidseitig) indiziert sein.

Indikationen zur CI-Versorgung werden bezüglich des Grades der Schwerhörigkeit zunehmend weiter gestellt. Dies gilt insbesondere für Patienten mit erhaltenem Restgehör, welches allein nicht für eine suffiziente Hörgeräteversorgung ausreicht [21, 22, 24, 26].

So kann beispielsweise für schwerhörige Patienten mit einem Hochtton-Steilabfall das erstmals von *v. Ilberg et al.* [73] beschriebene Therapiekonzept der elektrisch-akustischen Stimulation angewendet werden. Hierbei werden die noch funktionsfähigen, tieffrequenten apikalen Anteile der Cochlea akustisch und die ausgefallenen basalen Hochfrequenzbereiche elektrisch stimuliert. Diese bimodale Stimulation [74] wird durch das Tragen eines Hörgerätes und eines Cochlear-Implantates mit kurzem Elektrodenträger auf derselben Seite realisiert. Diverse klinische Studien konnten den zumindest teilweisen Erhalt des Restgehöres bei Patienten, die mit einem CI nach dem Konzept der kombiniert elektrisch-akustischen Stimulation versorgt worden sind, belegen [75, 76]. Für den Erfolg ist der Funktionserhalt des Tieffrequenzbereiches entscheidend, welcher laut *Adunka et al.* [25] durch atraumatische Implantationstechniken zu realisieren ist.

### 2.5.1 Aufbau und Funktion von Cochlear-Implantaten

Die Entwicklung der heutigen Cochlear-Implantate (CI) fand ihren Ursprung in Paris, wo *Djourno und Eyries* 1957 [77] ihre Erfahrungen mit der ersten elektrischen Stimulation des Hörnervs beim Menschen publizierten. Seither wurden weltweit über 140.000 Menschen mit einem CI versorgt und eine Vielzahl verschiedenster CI entwickelt, welche ständig optimiert werden [78].

Unter dem Begriff CI wird meist nicht nur das implantierte Bauteil verstanden, sondern die Kombination von extra- und intrakorporalen CI-Bauteilen [13], welche in Abbildung 3 dargestellt sind. Die extrakorporale Baugruppe besteht aus einer Batterie zur Energieversorgung, einem Mikrofon zur Schallaufnahme und einem Audioprozessor, der die zu übertragenden auditorischen Informationen in eine Abfolge von elektrischen Impulsen umwandelt und in Frequenzbänder selektiert. Die an den Erregungsschwellenwert und das individuell angenehme „Hörlevel“ des Patienten angepassten und kodierten Informationen werden schließlich mit Hilfe von Radiowellen transkutan auf die intrakorporale (implantierte) Baugruppe übertragen. Diese besteht aus einer Empfangsspule, welche die übertragenen Informationen dekodiert und in einem bestimmten Muster wieder als elektrische Impulse an ein Elektrodenbündel (Elektrodenarray) weiterleitet. Die gebündelten Elektroden sind über einen stützenden und isolierenden Elektrodenträger in der Cochlea platziert. Da die einzelnen Elektroden unterschiedlich weit in der Cochlea liegen, werden verschiedene Ganglienzellen des Hörnervs gereizt. Diese tonotope Reizung bildet die Frequenzdispersion des gesunden Innenohres nach und ermöglicht so einen Höreindruck beim CI-Träger [79, 13].

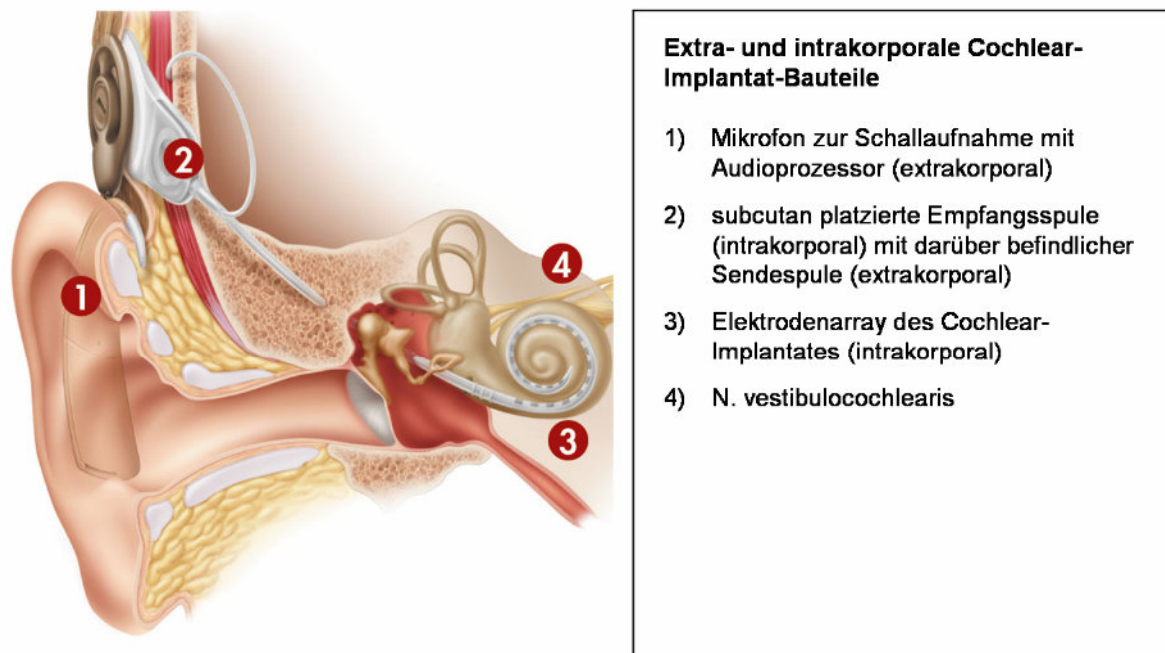


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Cochlear-Implantates [80]

## 2.5.2 Elektrodeninsertion

Die Insertion der Elektrode kann intra- oder extracochleär erfolgen. Bei den aktuellen Cochlear-Implantaten wird grundsätzlich eine intracochleäre Insertion durchgeführt. Lediglich für die monopolare Stimulation ist die Referenzelektrode extracochleär lokalisiert.

### 2.5.2.1 Operative Zugangswege

Der aktuelle Goldstandard bei der Operationsdurchführung der CI-Insertion ist der transmastoidale Zugangsweg mit nachfolgender posteriorer Tympanotomie. Die anschließende intracochleäre Positionierung der Elektrode erfolgt wahlweise durch die Membran des runden Fensters (Rundfenstermembran) oder mittels promotorialer Cochleostomie.

Zu Beginn der CI-Versorgung erfolgte der Zugang zur Scala tympani durch die Rundfenstermembran (transfenestrale Insertion) [81]. Die folglich weitgehende Zerstörung der Rundfenstermembran führt jedoch zu einer Störung der cochleären Hydrodynamik und zu einer Funktionsstörung des Aquaeductus cochleae. Aufgrund der anatomischen Enge ist beim Zugang über das runde Fenster außerdem eine Manipulation der Elektroden notwendig [20].

Aktuell erfolgt der Zugang zur Scala tympani daher bevorzugt mittels Cochleostomie, bei der durch einen „geraden“ Zugangsweg in die Cochlea eine direkte Einsicht in die Scala tympani möglich ist. Im Vergleich zum transfenestralen Zugang ist die Insertion der Elektrode laut

*Clark* [13] dadurch einfacher und weniger traumatisch. Die Fenestration des Promotoriums erfolgt bei der Cochleostomie anterioinferior des runden Fensters. *Briggs et al.* [82, 83] zeigten in ihren Studien, dass dadurch nicht nur eine Verletzung der Lamina spiralis ossea, sondern auch eine versehentliche Eröffnung der Scala vestibuli vermieden wird. Der Knochen wird dabei so weit abgetragen, bis die dünne fibröse Innenauskleidung des Endosts sichtbar ist. Eine frühzeitige und lang dauernde Eröffnung des Endosts erhöht das Risiko einer Infektion oder Schädigung intracochleärer Strukturen. *Lehnhardt* [20] empfiehlt aus diesem Grunde das Endost möglichst spät zu eröffnen und schnellstmöglich wieder zu verschließen, um einen insertionsbedingten zusätzlichen Hörverlust zu minimieren (sog. „soft surgery“-Technik).

Nach neueren Erkenntnissen gewinnt der Zugang zur Scala tympani durch die Rundfenstermembran jedoch an Bedeutung [84, 85, 86]. Dies gilt v.a. für die Verwendung von geraden flexiblen Elektrodenträgern, welche laut *Briggs et al.* [82] am wenigsten traumatisch zu inserieren sind, da sie im Vergleich zu vorgeformten Elektrodenträgern seltener die Basilarmembran perforieren. *Lenarz et al.* [86] zeigten, dass bei einer Implantation eines kurzen und geraden Elektrodenträgers durch die Rundfenstermembran in 95% der Fälle keine schwerwiegenden intracochleären Traumata auftraten.

### 2.5.2.2 Insertionstraumata

Ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung neuer Verfahren zur Elektrodeninsertion ist die Minimierung insertionsbedingter Traumata. Diese können zum einen durch direkte mechanische Manipulation oder indirekt als Reaktion auf die Eröffnung der Cochlea während der Implantation entstehen. Als mögliche Insertionstraumata sind zu nennen:

- Frakturen knöcherner Strukturen, wie beispielsweise der Lamina spiralis ossea, durch Anwendung der für die Cochleostomie eingesetzten chirurgischen Bohrer [87],
- Traumata des Lig. spirale durch mechanische Manipulation [88, 89],
- Zerstörung der vaskulären Integrität und der Zellen der Stria vascularis durch mechanische Manipulation [89] sowie durch Vibrationen, welche durch das Bohren ausgelöst werden [90],
- Akustisches Trauma der Haarzellen durch beim chirurgischen Bohren entstehende Schalldruckpegel von z.T. über 130 dB [91],
- Direkte Haarzellschädigung und Schädigung nervaler Strukturen durch mechanische Manipulation [13, 25],
- Penetration der Basilarmembran mit folglich Eröffnung der Scala media und Durchmischung von Peri- und Endolymph, welche sich toxisch auf die Stria vascularis und das Corti-Organ auswirkt [92, 93],

- versehentliche Eröffnung der Scala vestibuli während der Insertion [94] und Traumata der Reissner-Membran [89],
- Funktionsverlust des Corti-Organs (Störung der Ausbreitung der Wanderwelle) durch Verlust von Perilymphe während der intraoperativen Eröffnung des Innenohres [95],
- fibrotischer Gewebeumbau an dem Ort der Cochleostomie und entlang der implantierten Elektrode [96, 88],
- intracochleär reaktive Ossifikationen durch den bei der Bohrung entstehenden Knochenabrieb [63],
- unspezifische lokale Entzündungsreaktionen infolge der implantationsbedingten Gewebemanipulation [97] sowie infolge von Fremdkörpereintritt in die Cochlea, z.B. durch Blut [98] oder Knochenstaub [87],
- Infektionen [13, 25].

Für eine erfolgreiche CI-Versorgung ist das Vorhandensein möglichst vieler intakter Neuronen des N. cochlearis von entscheidender Bedeutung, so dass deren Schonung bei der Elektrodenimplantation besonders beachtet werden muss [61, 71]. Schäden nervaler Strukturen können auf vielfältige Weise verursacht werden. So führen beispielsweise Verletzungen der Lamina spiralis ossea zu Axonschäden und Verletzungen von Haarzellen zu einer Degeneration peripherer nervaler Dendriten. Diese nervalen Degenerationen können sich sekundär retrograd ausweiten und mit einem Spiralganglienzellverlust einhergehen [69, 99]. Wenn die Integrität der Basilarmembran, der Lamina spiralis ossea und des Corti-Organs gewahrt bleibt, können somit progrediente Degenerationen von Spiralganglienzellen und Nervenfasern vermieden werden [100, 101].

Durch die Schonung der intracochleären Strukturen sollen somit eine Verschlechterung des bestehenden Hörschadens sowie eventuell auftretende reaktive intracochleäre Strukturveränderungen vermieden und ein möglichst gutes Sprachverständnis ermöglicht werden.

### 2.5.2.3 Elektrodenlokalisierung

Die intracochleäre Insertion erfolgt überwiegend in die Scala tympani (intraluminär). Dort werden die Elektroden aktuell entweder frei in der Mitte (midmodiolar) oder dem Modiolus anliegend (perimodiolar) platziert [102]. Die perimodiolare Positionierung ist entwickelt worden, um die räumliche Distanz zu den Fasern des N. cochlearis möglichst gering zu halten. Im Vergleich zu midmodiolar lokalisierten Elektroden wird so eine Verminderung der Reizschwelle und der Kanalinteraktion sowie eine verbesserte Sprachdiskriminationsfähigkeit erreicht [103]. Das intracochleäre Trauma ist bei einer perimodiolaren Elektrodeninsertion jedoch größer als bei herkömmlichen midmodiolaren Elektroden [103, 104, 105].

*Klenzner et al.* [106] empfehlen zur Minimierung der insertionsbedingten Traumata daher Verbesserungen der Elektrodenbeschaffenheit und eine Insertion mittels Einführhilfe. Des Weiteren sollen zur Vermeidung von intracochleären Schäden laut *Adunka et al.* [25] keine forcierten Insertionsmanöver über den „Punkt des ersten Widerstandes“ hinaus durchgeführt und im Sinne einer elektrisch-akustischen Stimulation kurze flexible Elektrodenträger verwendet werden.

Bereits 1993 postulierte *Lehnhardt* [20], dass mit einer schonenden Implantation in „soft surgery technique“ das Restgehör der Patienten auch bei intraluminär platzierten Elektroden erhalten werden kann. Entscheidender Aspekt dieser Technik ist die sorgfältige Schonung des Endosts, um das Lumen der Scala tympani während der CI-Implantation so lange wie möglich geschlossen zu halten und es nach Eröffnung wieder so schnell wie möglich verschließen zu können. Gelingt es, so die Idee dieser Arbeit, das fibröse Endost behutsam von seiner knöchernen Unterlage zu trennen, könnte die Elektrode zwischen dem häutigen und knöchernen Labyrinth lateral des Lig. spirale platziert und so eine Eröffnung der Scala tympani komplett vermieden werden. Diese sog. endosteale Insertion wurde von *Lehnhardt et al.* [74] weiter entwickelt und 2004 als grundlegend neue Insertionsmöglichkeit für CI-Elektroden bei resthörigen Patienten publiziert. Durch diese intracochleäre, aber nicht intraluminäre Insertion, sollen mögliche Insertionstraumata und Infektionen vermieden und damit das Restgehör geschont werden.

In den letzten Jahren wurde daher ein Elektrodenmodell für die endosteale Insertion entwickelt, welches vor dem klinischen Einsatz jedoch noch ausführlicher mit Hilfe von Insertionsversuchen an Felsenbeinpräparaten auf seine Eignung hin getestet werden muss [107, 108, 109, 110]. *Pau et al.* [107, 108] konnten mit ihren Arbeiten, in denen zur Simulation Elektrodenträger aus Silikon oder Kunststoff verwendet wurden, bereits demonstrieren, dass eine Eröffnung der Scalae tympani et vestibuli vermieden werden kann. Der Elektrodenträger sollte hierfür ausreichend Biegesteifigkeit aufweisen, möglichst flach und der Konkavität der Schneckenwindung angepasst sein sowie streng tangential vorgeschoben werden. Um den Erhalt der membranösen Integrität zu beurteilen, wurden in darauffolgenden Insertionsversuchen reale endosteale Elektroden-Prototypen anstelle der simulierten Elektrodenträger implantiert [111]. In weiterführenden Studien an Felsenbeinpräparaten konnten *Pau et al.* [109] neue Erkenntnisse hinsichtlich einer chirurgischen Machbarkeit der endostealen Elektrodeninsertion gewinnen. Es gelang durch die Darstellung einer sog. „blue line“ (zeigt den lateralen Anteil der basalen Schneckenwindung an) bzw. „gray line“ (zeigt die Lage des Lig. spirale an) wichtige Orientierungshilfen für eine spätere Standardisierung eines chirurgischen Verfahrens zur endostealen Insertion zu geben.

## 2.6 Histologische Präparationsmethoden

Das Ziel aller histologischen Untersuchungen ist es, Informationen über die Ultrastruktur von Zellen, Geweben und Organen zu erhalten. Hierzu bedarf es vergrößernder Instrumente, wie z.B. Licht-, Fluoreszenz- und konfokale Mikroskope, und einer angepassten Vorbereitung des Untersuchungsgutes.

Für die Anwendung mikroskopischer Techniken sind i.d.R. geringe Gewebeschichtdicken erforderlich, was eines Materialabtrages in Form von Schnitt- oder Schliffpräparationen bedarf. Hierfür ist eine Mindestfestigkeit der zu untersuchenden Probe erforderlich. Um postmortale Zerfallserscheinungen zu verhindern sowie den augenblicklichen Zustand und die Struktur der Gewebe möglichst naturgetreu (nativ) festzuhalten, ist die Konservierung der Probe notwendig [112].

### 2.6.1 Probenvorbereitung

Die verschiedenen Methoden der Konservierung und Strukturverfestigung von Geweben werden als Fixierung bezeichnet [3].

#### 2.6.1.1 Chemische Fixierung

Durch Perfusion oder Immersion der Probe mit einer Fixierlösung (z.B. Alkohole oder Formaldehyd) kann das Gewebe chemisch fixiert werden. Infolge der Insolubilisierung der organischen Matrix werden dabei neue, chemisch aktive Gruppen verfügbar, die das stabilisierende Vernetzen der Matrixkomponenten bewirken [113].

Die Veränderungen der Zell- und Gewebestruktur hat jedoch nicht nur konservierende, sondern auch unerwünschte Wirkungen zur Folge. So führen osmotische Effekte bei der Interaktion mit dem Fixiermittel zur Schrumpfung oder Quellung von Geweben. Außerdem kann es im Verlauf des Fixierprozesses zur Verlagerung zytoplasmatischer Bestandteile durch die eindringende Front des Fixiermittels kommen, sog. Substanzflucht [112]. Durch diese unerwünschten Effekte wird die Probe derart verändert, dass die letztendlich im mikroskopischen Bild sichtbaren Strukturen z.T. nicht den tatsächlichen Gegebenheiten entsprechen, und als sog. Fixierungsartefakte zu bezeichnen sind.

#### 2.6.1.2 Physikalische Fixierung

Alternativ zur chemischen Fixierung kann der enzymatische Abbau durch rein physikalische Prozesse, wie z.B. Gefriertrocknung, Erhitzen oder Einfrieren des Gewebes, gestoppt



werden. Als Standardverfahren zur physikalischen Fixierung hat sich die Gefrier- bzw. Kryofixierung (Kryopräparation) etabliert [114].

Als Kühlmittel können grundsätzlich  $\text{CO}_2$  solid ( $-78^\circ\text{C}$ ), flüssiger Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) oder Isopentan, welches mittels flüssigem Stickstoff auf  $-160^\circ\text{C}$  gekühlt wird, verwendet werden [113].

Bei der Kryopräparation sind weder Entwässerung noch die Anwendung von Fixiermitteln oder hohen Temperaturen nötig. Dadurch werden Denaturierung von Proteinen, Schrumpfungen des Gewebes sowie Strukturverlagerungen innerhalb des Gewebes vermieden. Die Lokalisation niedermolekularer Bestandteile bleibt ebenfalls konstant, was für die Beurteilung anschließender Nachweismethoden von entscheidender Bedeutung ist. Durch die Minimierung von Fixierungsartefakten sowie der schnellen Verarbeitung der Gewebeprobe ist mittels Kryofixierung somit der Erhalt nativer Präparate möglich. Durch die im gefrorenen Zustand gegebene Strukturfestigkeit ist eine anschließende Präparateinbettung nicht erforderlich [112].

### 2.6.1.3 Präparateinbettung

Im Vergleich zu kryofixierten Präparaten weisen chemisch fixierte Präparate z.T. große Konsistenzunterschiede auf. Um eine feste und gut schneid- bzw. schleifbare Konsistenz zu erhalten, müssen chemisch fixierte Proben einem Einbettungsprozess unterzogen werden.

Das Prinzip des Einbettungsprozesses besteht darin, dass die Flüssigkeit, die das Gewebe durchtränkt, durch eine nachfolgende ersetzt wird. Hierfür wird das Gewebe über verschiedene Zwischenschritte aus der Fixierflüssigkeit in das Einbettungsmedium überführt. Die gebräuchlichsten Einbettungsmittel sind Paraffin, Celloidin, Gelatine und Kunststoffe [112]. Je nach Einbettungsmedium sind verschiedene Probenvorbereitungen notwendig. Der erste Schritt, welcher das Auswaschen der Fixierlösung mittels Alkohol oder Wasser beinhaltet, ist bei allen Techniken gleich.

Bei der Anwendung hydrophober Einbettungsmedien, z.B. Paraffin oder Celloidin, wird die Probe anschließend über mehrere Stunden bis Tage in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Intermedien, z.B. Methylbenzoat, Chloroform oder Isopropylalkohol, zur Entfernung des Alkohols gewaschen und schließlich in das eigentliche Einbettmedium gebracht. Das Entwässern der Proben kann zu Schrumpfungen (10 % – 15 % des ursprünglichen Volumens), Zerreißen und Härtung führen. Werden hingegen hydrophile Einbettungsmedien, z.B. Gelatine, angewendet, entfällt die Entwässerung mit Alkohol.

Das Grundprinzip der Präparateinbettung in Kunststoffe (Kunstharze) ist die Infiltration des Gewebes mit einer monomeren bzw. vopolymerisierten Kunststofflösung und das anschließende Starten der Polymerisation. Dabei wird zwischen Warm- und Kalteinbettung

unterschieden. Sollen für histologische Untersuchungen temperatur- oder druckempfindliche Proben eingebettet werden, wird ausschließlich die Kalteinbettung durchgeführt. Kalteinbettmedien bestehen aus zwei Komponenten (unvernetztes Polymer und Katalysator), welche sich nach dem Mischen vernetzen bzw. polymerisieren. Als Polymere werden u.a. Epoxydharze, Methacrylate oder ungesättigte Polyesterharze verwendet [113, 115].

## **2.6.2 Schnitt- und Schliffpräparation**

### **2.6.2.1 Schnittpräparation**

Zur Herstellung histologischer Schnittpräparate von sehr geringer Dicke verwendet man besondere Präzisionsgeräte, die als Mikrotome bezeichnet werden. Zum Schneiden werden hierin Messer und Präparat eingespannt und gegeneinander bewegt. Mittels eines Mikrometervorschubs kann die Schnittdicke gewählt werden. Anhand der Schnittdicke unterscheidet man zwischen lichtmikroskopisch verwendbaren Schnitten (5 – 20 µm), Semidünnschnitten (0,5 – 2 µm) und Ultradünnschnitten (30 – 100 nm) [32]. Die erreichbare Schnittdicke ist wesentlich von der Konsistenz des Einbettmediums abhängig. Beim Schneiden von in Paraffin eingebetteten Präparaten können höchstens 3 µm dünne Schnitte hergestellt werden. Die Einbettung in Kunststoff ermöglicht hingegen die Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten.

Durch Gefrieren der unfixierten oder fixierten Gewebe erzielt man die zum Schneiden der Objekte erforderliche Gewebehärtung, ohne dass eine Entwässerung oder Einbettung vorgenommen werden muss. Es können aber ebenso Präparate, die in sehr weiche Medien, wie z.B. Paraffin, eingebettet worden sind, durch Kryofixierung zusätzlich gehärtet werden. Für die Herstellung von Gefrierschnitten verwendet man einen Kryostat, in dem das Mikrotom in eine Kühlkammer eingebaut ist und somit Präparat, Messer und Zubehör dieselbe Temperatur aufweisen.

Das Schneiden mit dem Messer resultiert durch mechanische und thermische Einwirkung in einer unebenen und z.T. plastisch verformten Oberfläche [115]. Diese Strukturveränderungen können zur Einschränkung der Beurteilbarkeit auf zellulärer und subzellulärer Ebene führen.

### **2.6.2.2 Schliffpräparation**

Das Schleifen ist ein spanabhebendes Bearbeitungsverfahren, bei dem die oberen Materialsichten mit Hilfe gebundener Schleifkörner abgetragen werden [115, 116]. Ziel ist der Erhalt einer planen Oberfläche mit nur geringgradiger Verformung.

Je nachdem, ob unter Gasen (Luft, Schutzgas) oder unter Flüssigkeiten (in der Regel Wasser) geschliffen wird, unterscheidet man zwischen Trocken- und Nassschleifen. Das Schleifen unter Flüssigkeit ist zu bevorzugen, da durch diese der Abrieb gebunden und abtransportiert werden kann. Außerdem wird infolge der Kühlwirkung der Flüssigkeit die Erwärmung der Probenoberfläche und somit die Gefahr einer oberflächlichen Strukturänderung verringert. Das gebräuchlichste Schleifmittel zum Nassschleifen ist das auf wasserbeständigen Papieren oder Geweben gebundene Siliziumcarbid (SiC).

Der Schleifvorgang mit SiC-Papier setzt sich typischerweise aus einer Anzahl von Einzelschritten zusammen, bei denen stets feiner werdende Schleifpartikel (Körnung) verwendet werden. Jeder Schleifschritt sollte dabei die vorangegangene Verformung beseitigen, verursacht seinerseits allerdings neue Schäden. Mit feiner werdender Körnung nimmt die Tiefe der Deformation ab.

Das schichtweise Abschleifen einer Probe ermöglicht eine umfassende und exakte Beurteilung des Präparates, da im Gegensatz zur Schnittpräparation keine Materialverluste (Sägeblattbreite etc.) auftreten [117]. Außerdem können durch die schrittweise ablaufende Beseitigung der Deformation im Vergleich zur Schnittpräparation deutlich planere Probenoberflächen erreicht werden [115, 118].

### 2.6.3 Verarbeitung von hartem Gewebe

Knochengewebe sowie die Hartgewebe des Zahnes (Dentin) erhalten ihre besondere mechanische Eigenschaft durch die Einlagerung von Mineralsalzen (anorganische Verbindungen wie z.B. Hydroxylapatit) in eine organische Matrix. Die sich daraus ergebende Härte stellt besondere Anforderungen an die histologische Präparationstechnik.

Es lassen sich zwar durchaus Schliffpräparate von unfixierten und uneingebetteten Hartgeweben anfertigen, dabei muss jedoch auf zelluläre Details und die Erhaltung der Weichgewebe verzichtet werden, da durch die mechanische Belastung beim Bearbeitungsprozess Gewebeveränderungen unvermeidbar sind [112].

Um sowohl organische als auch anorganische Strukturen der Hartgewebe darstellen zu können, stehen im Wesentlichen zwei Verfahren zur Verfügung. Zum einen können die Präparate in Kunststoffe, welche eine ähnliche Härte wie Knochengewebe aufweisen, eingebettet und anschließend geschnitten bzw. geschliffen werden. Zum anderen kann durch Kryofixierung der Präparate die Herstellung von Gefrierschnitten ermöglicht werden.

Liegt das Interesse der Untersuchung nicht auf dem mineralisierten, sondern auf dem organischen und zellularen Anteil des Knochengewebes, können zur besseren Darstellung die anorganischen Substanzen herausgelöst werden. Dieser Vorgang wird als Dekalzifizierung (Entkalkung) bezeichnet. Die Entkalkung kann durch Säuren oder Chelatbildung erfolgen. Bei der Anwendung von Säuren ist zu beachten, dass diese nicht nur

auf anorganische Substanzen wirken, sondern beispielsweise auch zur Hydrolyse von Nukleinsäuren und Hemmung der meisten Enzyme führen. Für einige Fragestellungen ist säureentkalktes Gewebe daher ungeeignet. Sollen Nukleinsäuren und Enzyme nicht beeinflusst werden, muss die Dekalzifizierungsreaktion im schwach alkalischen Bereich ablaufen. Dies ist bei der Entkalkung mittels eines Chelatbildners wie EDTA möglich. EDTA bindet freie Kalziumionen, welche im Laufe der Reaktion ständig aus dem Knochen freigegeben werden, bis das Hydroxylapatit gänzlich aufgelöst ist. Entkalkte Proben werden anschließend in derselben Weise wie Weichteilgewebe weiterbehandelt. Der Prozess der Dekalzifizierung dauert jedoch mehrere Tage an und ist für Fragestellungen, welche ein schnelles Ergebnis erfordern, ungeeignet [113].

## 2.7 Methoden zur Evaluation der Elektrodeninsertion an post-mortem Felsenbeinpräparaten

Vor jeder in-vivo-Insertion einer neu entwickelten Elektrode ist grundsätzlich der Machbarkeitsnachweis in ex-vivo-Versuchen zu erbringen. Mit der bereits erwähnten Indikationserweiterung des Cochlear-Implantates auf Patienten mit erhaltenem Restgehör ist eine möglichst atraumatische Insertion der Elektroden hierbei von besonderem Interesse. Daher ist sowohl die intracochleäre Lagebestimmung des CI-Elektrodenträgers als auch die Evaluation insertionsbedingter Traumata bedeutsam. Hierfür kommen verschiedene radiologische, histologische sowie elektronenmikroskopische Verfahren zur Anwendung. Nachfolgend werden publizierte Präparations- und Nachweismethoden verschiedener Arbeitsgruppen beschrieben.

*Shepherd et al.* [119], *Kennedy* [120] und *O'Leary et al.* [121] wendeten zur histomorphologischen Aufarbeitung von Felsenbeinen eine gemeinsame Methode an. Hierbei erfolgte nach der CI-Elektrodeninsertion in frische oder formalinfixierte Präparate die Dekalzifizierung in EDTA-Lösung mit anschließender Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe. Danach wurden die Elektrodenträger wieder entfernt, das Felsenbeinpräparat in Paraffin eingebettet und anschließend geschnitten. Die jeweiligen Schnitte wurden mit Haematoxylin-Eosin angefärbt und anschließend zur lichtmikroskopischen Untersuchung auf Objektträgern fixiert.

Diese Technik wurde im Wesentlichen nur hinsichtlich des Zeitpunktes der CI-Elektrodenentfernung variiert. *Welling et al.* [122] entfernten den CI-Elektrodenträger bereits vor der Entkalkung, welche anstelle von EDTA-Lösung mit 1%iger Salpetersäure durchgeführt wurde. *Richter et al.* [104] verzichteten bei einem Teil der von ihnen untersuchten Felsenbeine auf die Entfernung des CI-Elektrodenträgers. Dies führte jedoch zu

schnittpräparationsbedingten Artefakten, da die unterschiedliche Härte von Paraffin und Elektrodenträger zum Abstumpfen des verwendeten Schneidblattes führte und die Gefahr der Elektrodendislokation erhöht wurde.

Histologische Schnitte von entkalkten Felsenbeinpräparaten haben den Vorteil, dass aufgrund der geringen Schnittdicke eine Aufarbeitung der Cochlea in zahlreichen Schnitten mit exakter Darstellung auch diskreter feinstruktureller Veränderungen möglich ist [123]. Der Nachteil der Methode liegt darin, dass eine Darstellung des Elektrodenträgers in-situ nicht möglich ist, da dieser beim Präparationsprozess entfernt werden muss [104]. Dadurch sind keine sicheren Aussagen über die intracochleäre Lokalisation des Elektrodenträgers sowie über die potenzielle Ursache (elektrodenimplantations- oder -explantationsbedingt) des cochleären Traumas möglich.

*Gstoettner et al.* [124, 125] wendeten in ihren Arbeiten über die Beurteilung des Ausmaßes insertionsbedingter Traumata bei tiefer Elektrodeninsertion eine histologische Präparationsmethode an, die das Schneiden von Felsenbeinen mit in-situ liegender Elektrode ermöglicht. Das Prinzip der eingesetzten Hartschlifftechnik wurde von *Plenk* [126] detailliert beschrieben und von *Lehnhardt* [127] bereits für Felsenbeinuntersuchungen genutzt. *Gstoettner et al.* verwendeten für ihre Studien frische Felsenbeine, in die 16 – 18 Stunden post-mortem die Elektrodenträger implantiert wurden. Um die Lage des Elektrodenträgers zu dokumentieren, wurden nach der Implantation alle Felsenbeine konventionell geröntgt. Die Präparate wurden anschließend in Formalin fixiert, in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert und schließlich in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet. Durch die Kunststoffeinbettung war es möglich, Felsenbeinpräparate ohne vorherige Dekalzifizierung und mit der implantierten Elektrode schneid- und schleifbar zu machen. Die erhaltenen Schliffpräparate wurden mit Giemsa-Lösung gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

Mit dem von *Gstoettner et al.* [124, 125] angewandten histologischen Präparationsverfahren der Hartschlifftechnik ließen sich die cochleären Strukturen (u.a. die Reissner-Membran) sowie eventuelle Insertionstraumata deutlich darstellen. Außerdem konnten die genaue Position der implantierten Elektrode ausgemacht und potenzielle Schäden von Innenohrstrukturen durch das Entfernen der Elektrode vermieden werden.

*Richter et al.* [128] verglichen in ihrer Studie die perimodiolare „Nucleus Contour Elektrode“ mit der midmodiolarer „Nucleus Standard Straight Elektrode“ im Hinblick auf die verursachten Insertionstraumata. Sie verwendeten für ihre Untersuchung native gefrorene Felsenbeinpräparate, welche kurz vor der Elektrodeninsertion aufgetaut wurden. Die Lokalisation der intracochleären Elektrode wurde mittels drei verschiedener radiologischer Methoden bestimmt: 1. konventionelle Röntgenaufnahme mit angepasster Projektionsebene

nach der von *Xu et al.* etablierten radiologischen Standardprojektion „cochlear view“ [129, 130]; 2. Fluoroskopie (Durchleuchtung) [123]; 3. Digitale Volumentomographie (Kegelstrahl-Computertomografie) [131]. Nachfolgend wurden die Felsenbeinpräparate in Formalin fixiert, in aufsteigender Ethanolreihe dehydriert und in einem Polymerisationssystem auf der Basis von Methylmethacrylat (MMA) eingebettet. Wie bei *Gstoettner et al.* [124, 125] erfolgte die weitere Präparation mittels Hartschlifftechnik. Zur Darstellung der cochleären Feinstruktur wurden die Schliffpräparate mit Azur II und Pararosanilin gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

Bei dem initial angewandten MMA-Polymerisationssystem „Technovit 9100“ zeigte sich in der histologischen Begutachtung der Schliffpräparate eine Schwellung des Elektroden-trägers, welche laut *Richter et al.* [128] auf eine chemische Reaktion der Silikonummantelung mit dem Einbettmedium zurückzuführen ist. Daraufhin erfolgte die Umstellung auf das MMA-Polymerisationssystem „Technovit 7200“, worunter deutlich weniger Schwellungsartefakte auftraten.

Neben dem Auftreten von Präparationsartefakten bei der Kunststoffeinbettung wurde die Limitierung der Anzahl möglicher Schliffpräparate als Nachteil der angewandten Methode aufgeführt. Da bei der Hartschlifftechnik vor der eigentlichen Schleifprozedur zunächst Schnittpräparate angefertigt werden mussten und die Schnittdicke hierfür recht groß gewählt wurde, konnten pro Cochlea nur ca. 6 – 10 Präparate hergestellt werden, welche anschließend geschliffen und histologisch aufgearbeitet worden sind [123].

Mit der Methode der Digitalen Volumentomographie war es möglich, die intracochleäre Position des CI-Elektroden-trägers an jeder Stelle der Cochlea digital zu errechnen. Damit konnte nicht nur eine Aussage zur Lokalisation des Elektroden-trägers, sondern auch zum Vorliegen einer eventuellen Elektroden-trägerdislokation von der Scala tympani in die Scala vestibuli mit Bestimmung der Penetrationsstelle getroffen werden. Aufgrund der ungenügenden Bildauflösung war jedoch keine exakte Bestimmung der intracochleären Traumata möglich.

Die genaue Darstellung insertionsbedingter Traumata ist daher nicht durch die angewandten radiologischen Verfahren [128], sondern nur durch eine mikroskopische Untersuchung histologischer Schnittpräparate möglich [123], weshalb die Methode der MMA-Einbettung zur Evaluation der Elektrodeninsertion auch in anderen Studien Anwendung fand (z.B. *Klenzer et al.* [106], *Aschendorff et al.* [132], *Richter et al.* [128, 104, 133]).

*Richter et al.* [123] hatten sich in ihrer Studie zur Methodik der Evaluation perimodiolärer CI-Elektroden-träger zum Ziel gesetzt anhand eines Felsenbeinmodelles eine möglichst einheitliche Bewertungsgrundlage intracochleärer Schädigungen zu schaffen und damit eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Elektroden-trägersysteme zu ermöglichen. Es wurde ein

Schema entwickelt, das den Schaden beschreibt und die Schadensfolgen im Sinne einer möglichen Degeneration neuronaler Elemente oder intracochleärer narbiger Veränderungen einschätzt. Der Einschätzung der Schadensfolgen entsprechend wurde eine fünfstufige Gradeinteilung vorgenommen, welche in Tabelle 3 zusammengefasst ist.

Tabelle 3: Cochleäre Traumata: Art der Schädigung, Einschätzung der Schadensfolge und Gradeinteilung nach *Richter et al.* [123] (BM = Basilarmembran; M = Modiolus; LS = Lig. spirale; LSO = Lamina spiralis ossea; ST = Scala tympani; SV = Scala vestibuli)

Beschreibung des Schadens	Schadensfolge	Grad
Anhebung der BM ohne Ruptur; Imprimierung des M oder der LS	unerheblich	1
Punktförmige Penetration des Elektrodenträgers von der ST (durch die BM hindurch) in die SV	gering	2
Langstreckige Ruptur der BM	mittelschwer	3
Frakturierung und Dislokation der LSO	schwer	4
Frakturierung oder Penetration des M	katastrophal	5

*Eshraghi et al.* [134] wendeten in ihrer Studie zur Beschreibung cochleärer Insertionstraumata dreier perimodiolarer CI-Elektroden eine Gefrierschnitttechnik an, welche die Beurteilung der Elektrodenlokalisierung sowie des cochleären Traumas bei in-situ belassener Elektrode ermöglicht. Nach der Elektrodeninsertion, welche videofluoroskopisch kontrolliert wurde, erfolgte eine Auffüllung der Cochlea mit Kochsalzlösung. Danach wurde das Felsenbein tiefgeköhlt und anschließend in eine halbgefrorene Methylcellulosesuspension überführt und erneut eingefroren. In einem Kryostat wurden aus dem erhaltenen Präparatblock 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, welche lichtmikroskopisch untersucht und fotografisch dokumentiert wurden. Anhand der digitalen Fotos wurde die Insertionstiefe und Lage jeder Elektrode bestimmt und das Ausmaß des cochleären Traumas auf einer Scala von 0 (kein makroskopisch sichtbares Trauma) bis 4 (schweres cochleäres Trauma) eingestuft (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Schema zur Beurteilung des cochleären Traumas nach *Eshraghi et al.* [134]

Grad	Art des cochleären Traumas nach CI-Elektrodeninsertion
0	Makroskopisch kein sichtbares Trauma
1	Anhebung der Basilarmembran
2	Ruptur der Basilarmembran
3	Dislokation der CI-Elektrode in die Scala vestibuli
4	Schweres cochleäres Trauma (z.B. Fraktur der Lamina spiralis ossea oder des Modiolus, Gewebszerreiung im Bereich von Stria vascularis und Lig. spirale)

Wie bei der Präparateinbettung in Kunststoffe war durch die Anwendung der Gefrierschnitttechnik eine Untersuchung von Felsenbeinpräparaten mit in-situ liegender CI-Elektrode möglich. Die mikroskopische Anatomie der Cochlea ließ sich trotz der relativ geringen Vergrößerung gut darstellen. Da nach erfolgter Schnittpräparation keine Kühlung der Präparate mehr erfolgte, konnte eine dauerhafte Bewahrung histologischer Strukturen nicht gewährleistet werden. Die Evaluation war daher von der Qualität der fotografischen Dokumentation abhängig [134].

*Pau et al.* [108] führten nach Insertion eines endostealen „Elektroden-Träger-Simulators“ in formalinfixierte Felsenbeinpräparate zur histologischen Aufarbeitung eine Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe mit abschließender Acetoninfiltration durch. Danach erfolgte mit einem kalthärtenden, niedrigviskosen 2-Komponenten-Epoxydharzsystem unter Vakuum eine Austauschinfiltation. Die entstandenen Blockpräparate wurden mittels einer Diamantdrahtsäge unter Wasserkühlung getrimmt. Die endgültige Einbettung in den Schleifzylinder wurde ebenfalls mit kalthärtendem Epoxydharz vorgenommen. Anschließend erfolgte die Zielpräparation mittels aufsteigender SiC-Schleifpapierkörnung und die Feinpolitur mit einer Aluminiumoxid-Suspension.

Für eine kontrastreiche Darstellung und Gewebedifferenzierung wurden die verschiedenen Oberflächen nach jedem Schleifvorgang mit einer Kombination aus Toluidinblau und Giemsa-Lösung angefärbt. Die gefärbten Schliffebenen wurden lichtmikroskopisch untersucht und mittels digitaler Fotografie dokumentiert. In einer früheren Studie [107], welche sich mit der Machbarkeit der endostealen CI-Elektrodeninsertion befasste, wurden die formalinfixierten Felsenbeinpräparate mit dem implantierten „Elektroden-Träger-Simulator“ darüber hinaus elektronenmikroskopisch untersucht.

Sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch wurden Trocknungsartefakte mit Schrumpfung und lateraler Ablösung der die Skalen umhüllenden Weichteilsstrukturen dokumentiert, welche durch die Präparateinbettung verursacht wurden.

*Stöver et al.* [135] geben in ihrer Studie zur Evaluation verschiedener Insertionstechniken bei zwei Varianten von Prototypen eines „Contour“-Elektroden-Trägers eine detaillierte Beschreibung zur Auswahl und Durchführung der angewandten Methode.

Es wurden gefrorene Felsenbeinpräparate verwendet, welche kurz vor der Elektrodeninsertion aufgetaut wurden. Nach fluoroskopisch kontrollierter Insertion wurden die Präparate konventionell geröntgt, um die Lage sowie mögliche Abknickungen des Elektroden-Trägers darzustellen. Anschließend wurden die Präparate mittels Glutaraldehyd fixiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe mit abschließender Acetoninfiltration dehydriert und bei 60°C getrocknet. Danach erfolgte, ähnlich der Arbeitsgruppe von *Pau et al.* [107, 108], unter



Vakuum und bei Raumtemperatur die Kunststoffeinfettung in Epoxydharz. Nachdem die Position der Cochlea innerhalb des Felsenbeinpräparates mittels einer konventionellen Röntgenaufnahme bestimmt wurde, erfolgten die Trimmung des Präparates und anschließende Wiedereinfettung in Epoxydharz. Basierend auf den Arbeiten von *Gstoettner et al.* [124, 125] wurden die Epoxydharzblöcke mittels einer für die Materialographie entwickelten Schleifmaschine schichtweise geschliffen und poliert. In jeder erhaltenen Schicht wurden die knöchernen Strukturen mittels Silbernitrat und die Weichteilstrukturen mittels Alizarinviolett gefärbt, lichtmikroskopisch untersucht und mittels digitaler Fotografie dokumentiert. Die Beurteilung des Grades des cochleären Traumas erfolgte anhand des Schemas, welches von *Eshraghi et al.* [134] entworfen wurde.

*Stöver et al.* [135] erachten die Methodik der Fluoroskopie [136, 137, 138] sowie der konventionellen Röntgenaufnahme [129] als ungeeignet zur Evaluation insertionsbedingter Traumata, da sie keine Informationen bezüglich der cochleären Feinstruktur liefern. Die von *Aschendorff et al.* [132] angewandten radiologischen Verfahren (single- und multi-slice CT sowie „Rotational Tomography“) sind nach *Stöver et al.* wegen der Artefakte, die durch das Metall der Elektrode verursacht werden, ebenfalls nicht zweckmäßig. Deutlich artefaktfreier und damit zur Evaluation der Elektrodeninsertion besser geeignet, ist die Digitale Volumentomographie (Kegelstrahl-CT). Als geeignetste Technik zur Evaluation der Elektrodenlokalisation und der insertionsbedingten cochleären Traumata sehen *Stöver et al.* die von ihnen eingesetzte Hartschlifftechnik an, da die mikroskopische Untersuchung der erhaltenen Schliffpräparate die cochleären Mikrostrukturen hochauflösend zur Darstellung bringt. Als Nachteil dieser Technik wird der große zeitliche Aufwand genannt.

*Briggs et al.* [84] haben in ihrer Untersuchung zu einem neuen Elektrodenträgerprototyp ebenfalls gefrorene Felsenbeinpräparate verwendet, welche vor der Elektrodeninsertion aufgetaut wurden. Bei einem Teil der Präparate wurde die Insertion unter fluoroskopischer Kontrolle durchgeführt. Anschließend wurde bei allen Präparaten die Insertionstiefe röntgenologisch vermessen. Die folgende Präparataufarbeitung erfolgte in ähnlicher Weise wie bei den Arbeitsgruppen um *Pau et al.* [107, 108] und *Stöver et al.* [135]. Die Felsenbeine mit der in-situ liegenden Elektrode wurden mittels Formalin fixiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und unter Vakuum in Epoxydharz eingebettet. Die entstandenen Blockpräparate wurden anschließend getrimmt und unter konventioneller radiologischer Kontrolle in korrekter anatomischer Ausrichtung erneut in Epoxydharz eingebettet. Nach erfolgter Schnitt- und Schliffpräparation wurden die jeweiligen Schliffebenen mit Toluidinblau gefärbt, lichtmikroskopisch untersucht und fotografisch dokumentiert.

*Adunka et al.* [23, 25, 139] führten in ihren Untersuchungen zur Evaluation der Insertion verschiedener CI-Elektroden-trägersysteme an frischen post-mortem entnommenen Felsenbeinpräparaten die Formalinfixierung ebenfalls erst nach erfolgter Implantation durch. Nach anschließender Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe erfolgte über vier Wochen die Kalteinbettung in Polymethylmethacrylat (PMMA). Hiernach wurde die Insertionstiefe des implantierten Elektroden-trägers wie in den Arbeiten von *Marsh et al.* [140], *Xu et al.* [130] und *Cohen et al.* [129] mittels konventioneller Röntgenuntersuchungen kontrolliert. Im Anschluss an eine Schnitt- und Schliffpräparation der eingebetteten Präparate wurden die jeweiligen Schliffebenen mit Giemsa-Lösung gefärbt, lichtmikroskopisch untersucht und mittels digitaler Fotografie dokumentiert.

Die Proben wurden anhand eines standardisierten Protokolls, welches bereits in früheren Studien dieser Arbeitsgruppe [23, 85] Anwendung fand, analysiert. Dieses Protokoll beinhaltet die Beurteilung des Ausmaßes des cochleären Traumas anhand des von *Eshragi et al.* [134] entwickelten Schemas sowie die Evaluation der Elektrodenlokalisation und der erfolgten Cochleostomie. Das cochleäre Trauma wurde zusätzlich anhand seiner wahrscheinlichen Genese klassifiziert, welche die Verletzung basaler cochleärer Strukturen durch das Bohren der Cochleostomie sowie die Verformung cochleärer Strukturen durch elektrodenbedingte Verdrängung umfasst.

*Aschendorff et al.* [132] prüften in ihrer Studie die Anwendung von single-slice Computertomographie (CT), multi-slice CT und „Rotational Tomography“ zur Beurteilung der Lokalisation von CI-Elektroden-trägern. Die CI-Elektroden wurden sowohl in gefrorene Felsenbeinpräparate als auch in formalinfixierte Leichenköpfe implantiert. Nachfolgend wurden die Präparate mittels der genannten drei radiologischen Verfahren untersucht. Für die „Rotational Tomography“ kam ein Digitales Subtraktionsangiographiegerät zur Anwendung, das in der klinischen Praxis zur dreidimensionalen Darstellung von Gefäßen verwendet wird. Aus den Leichenköpfen wurde anschließend das Labyrinth mit dem in-situ liegenden CI-Elektroden-träger herauspräpariert und histologisch mittels MMA-Einbettung und Hartschlifftechnik aufgearbeitet. Somit konnten die gewonnenen histologischen Schnittbilder mit den entsprechenden „Rotational Tomography“-Bildern hinsichtlich der Elektrodenlokalisation verglichen werden.

*Aschendorff et al.* [132] haben gezeigt, dass mit allen drei angewandten radiologischen Verfahren die CI-Elektroden mit intracochleärer Lage darstellbar sind. Single- und multi-slice-CT sind wegen der Artefakte, welche durch die Materialeigenschaften des Elektroden-trägers bedingt sind, zur genauen Positionsbestimmung ungeeignet. Obwohl die Artefakte beim multi-slice CT etwas geringer ausgeprägt sind, kann dennoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Elektrode in der Scala tympani oder Scala vestibuli lokalisiert ist.

Anhand des Vergleiches mit den histologischen Schnittbildern konnten *Aschendorff et al.* [132] zeigen, dass mit dem Verfahren der „Rotational Tomography“, wegen der höheren Bildauflösung und des geringeren Ausmaßes an Artefakten, eine genaue intrascale Lokalisation des CI-Elektrodenträgers möglich ist.

*Postnov et al.* [141] beschreiben in ihrer Arbeit erstmalig die Anwendung der Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) zur Visualisierung cochleärer Strukturen und zur Evaluation elektrodeninsertionsbedingter Traumata. Sie verwendeten hierfür drei Felsenbeinpräparate, welche sowohl formalinfixiert als auch unfixiert waren.

Das erste Felsenbeinpräparat wurde zur Darstellung einer Idealsituation, in der weder die Dicke der zu durchdringenden Knochensubstanz zu einer Signalabschwächung führt noch metallische Elemente des CI-Elektrodenträgers zu Artefakten führen, besonders präpariert. Es wurde anstelle einer kommerziellen CI-Elektrode ein Silikondummy implantiert und anschließend dieses Felsenbeinpräparat mittels anorganischer Säuren entkalkt.

In das zweite und dritte Felsenbeinpräparat wurde hingegen eine metallhaltige CI-Elektrode implantiert. Diese Präparate wurden sowohl vor als auch nach der Elektrodeninsertion mit dem Mikro-CT untersucht, so dass mittels digitaler Subtraktions- und Superpositionstechniken ein artefaktfreies Bild generiert werden konnte. Um eine zusätzliche Kontrastverstärkung zu erreichen, wurde beim dritten Felsenbeinpräparat die intracochleäre Flüssigkeit durch Luft ersetzt.

Mittels der angewandten Mikro-CT-Untersuchung konnten, bis auf die Reissner-Membran, alle relevanten cochleären Strukturen sowie die CI-Elektrode in hoher Bildauflösung dargestellt werden und mit Hilfe digitaler Bearbeitungsprozesse dreidimensionale Felsenbeinmodelle errechnet werden. Mit konventionellen radiologischen Verfahren (z.B. Fluoroscopie oder „cochlear view“) können hingegen nur zweidimensionale Bilder mit sehr geringem Kontrast zwischen Hart- und Weichteilgewebe erzeugt werden. Somit lassen sich zwar Insertionstiefe und Lokalisation der Elektrode orientierend darstellen, eine detaillierte Aussage zu endocochleären Strukturen ist hingegen nicht möglich. Im Gegensatz zu histologischen Techniken sind für die Mikro-CT-Untersuchung nur wenige vorangehende Präparationsschritte notwendig. Die beispielsweise durch Einbett-, Schnitt- bzw. Schleifprozesse bedingten Artefakte werden somit vermieden. Ein weiterer Vorteil dieses nicht-invasiven radiologischen Verfahrens ist die Möglichkeit, Schnittebenen in jeder beliebigen Ausrichtung virtuell zu erzeugen, ohne dabei das zu untersuchende Präparat zu zerschneiden, wodurch es noch für weitere Untersuchungen verwendet werden kann.

*Eshraghi et al.* [142] haben anhand tierexperimenteller Studien mit Meerschweinchen die zellulären Mechanismen elektrodeninsertionsbedingter Traumata untersucht. Den

verwendeten Meerschweinchen wurden zu Lebzeiten CI-Elektroden implantiert und die jeweiligen Felsenbeine post-mortem entnommen. Die Corti-Organen wurden anschließend durch Mikrodissektion präpariert, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Farbstoffe fanden Fluorescein-isothiocyanat (FITC)-Phalloidin zur Markierung der Haarzellen und Propidiumiodid zur Markierung der Zellkerne Anwendung. Zelluntergänge konnten anhand von Zellkernkondensationen und Apoptosekörperchen zur Darstellung gebracht werden, welche in den elektrodennahen Haarzellen besonders häufig auftraten.

## 2.8 Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie, markierte Antikörper zur Detektierung bestimmter Zell- oder Gewebestrukturen zu verwenden, wurde bereits Anfang der 1940er Jahre von *Coons et al.* [143, 144] erstmalig beschrieben. In den darauf folgenden Jahren wurde dieses Verfahren aufgrund methodischer Weiterentwicklungen und der Herstellung einer großen Anzahl hochspezifischer (monoklonaler) Antikörper zu einem wesentlichen Bestandteil von naturwissenschaftlicher Forschung und medizinischer Diagnostik [145].

Anfang der 1980er Jahre wurden die ersten immunhistochemischen Untersuchungen am Innenohr von Säugetieren durchgeführt. Dabei waren zunächst vor allem zytoskelettale und kontraktile Proteine von Interesse [146, 147, 148]. Im weiteren Verlauf wurden die an der cochleären Innervation sowie mechanoelektrischen beziehungsweise mechanochemischen Transduktion beteiligten Strukturen und Moleküle nachgewiesen [145].

### 2.8.1 Grundlagen

Eine Substanz, die im Organismus eine Immunreaktion hervorrufen kann, wird als Antigen (AG) bezeichnet. Dabei handelt es sich zumeist um Proteine und Oligopeptide, wobei aber auch Polysaccharide oder komplexe Lipide als Antigen erkannt werden können. Die molekularen Strukturen eines Antigens, die mit den induzierten Immunprodukten (Antikörper, T-Zell-Rezeptoren, Paratope) reagieren, werden als antigene Determinanten (Epitope) bezeichnet. Die Bindungsstärke zwischen Paratop und Epitop im primären AG-AK-Komplex wird als Affinität bezeichnet.

Mittels der bei immunhistochemischen Techniken angewandten, spezifischen Antikörper lassen sich antigene Komponenten (z.B. Proteine) in Zellen und Geweben präzise darstellen. Klassische histologische Färbungen können Zell- und Gewebestandteile nur anhand gleichartiger chemischer oder physikalischer Eigenschaften charakterisieren. Da sich unterschiedliche Proteine mit verschiedenen biologischen Funktionen hinsichtlich ihrer

physikochemischen Eigenschaften aber durchaus ähneln können, sind klassische histologische Färbungen zur Proteindarstellung zum Teil ungeeignet. Die Möglichkeit des spezifischen Proteinnachweises stellt somit einen wesentlichen Vorteil der Immunhistochemie dar.

Die Bindung eines spezifischen Antikörpers an das darzustellende Antigen und die anschließende Visualisierung des gebundenen Antikörpers stellt das Grundprinzip aller immunhistochemischen Techniken dar.

Die Antigendarstellung kann direkt oder indirekt erfolgen. Dementsprechend unterscheidet man direkte (Einschichtmethoden) und indirekte Methoden (Zwei- oder Mehrschichtmethoden). Der Antikörper, der gegen das zu findende Antigen gerichtet ist, wird als Primärantikörper bezeichnet.

Bei der direkten Methode (Einschichtmethode) reagiert der mit einer Markersubstanz konjugierte Primär-AK, das sog. Konjugat, direkt mit dem Gewebean antigen. Da es hierbei nur einer AK-Inkubation und weniger Waschprozeduren bedarf, ist die Methode schnell durchführbar. Allerdings muss dann auch für jedes nachzuweisende Antigen ein spezifisches Konjugat zur Verfügung stehen. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist das resultierende, nur sehr schwache Farbsignal. Um das Signal zu verstärken, müssen die Primär-AK in hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Da dies zum einen sehr kostenintensiv ist und zum anderen eine starke unspezifische Hintergrundfärbung verursacht, wird die direkte Methode heutzutage kaum noch angewendet.

Bei der indirekten Methode bindet ein unkonjugierter Primär-AK an das interessierende Gewebean antigen. Nachdem in einer Waschprozedur alle überschüssigen und ungebundenen Primär-AK entfernt wurden, wird ein zweiter, sog. Sekundärantikörper hinzugegeben (Zweischichtmethode). Dieser Sekundär-AK ist mit einer Markersubstanz gekoppelt und reagiert mit dem Fc-Fragment des Primär-AK. Dabei muss der Sekundär-AK spezifisch gegen die Tierspezies des Primär-AK gerichtet sein. Dieses Verfahren ist sensitiver und in der Auswahl der verwendeten AK flexibler als die direkte Methode. Die mit der höheren Sensitivität einhergehende Signalverstärkung wird dadurch erzielt, dass mehrere Sekundär-AK an einen Primär-AK binden können. Wird zur weiteren Signalverstärkung noch eine Schicht konjugierter Antikörper (Tertiär-AK) hinzugegeben, die gegen die Tierspezies des Sekundär-AK gerichtet sind, so spricht man von einer doppelt indirekten Methode (Mehrschichtmethode). Von Nachteil ist jedoch, dass mit steigender Anzahl verwendeter Antikörper auch das Risiko ungewollter Kreuzreaktionen zunimmt.

## 2.8.2 Immunhistochemische Methoden und Markersubstanzen zur Visualisierung der immunhistochemischen Reaktion

Eine immunhistochemische Reaktion muss für die Auswertung im Licht-, Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Zu diesem Zweck werden Markersubstanzen verwendet, die in ein farbiges Reaktionsprodukt umgewandelt bzw. durch deren eigene Elektronendichte sichtbar gemacht werden.

Die am häufigsten zum Einsatz kommenden Markersubstanzen sind Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) und Enzyme. Radioaktive Isotope sowie partikuläre Materialien, wie z.B. quervernetztes Latex, Schwer- und Edelmetalle, finden ebenfalls Anwendung.

Unter Fluoreszenz versteht man die Eigenschaft von Stoffen, die durch Absorption energiereicher Strahlen einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, kurzzeitig Licht (energieärmere Strahlung mit größerer Wellenlänge) zu emittieren. Stoffe mit dieser Fähigkeit nennt man Fluoreszenzfarbstoffe. Die Immunfluoreszenz, das heißt die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an Antikörper, stellt die älteste immunhistochemische Nachweismethode dar. Sie wurde bereits 1941 von *Coons* et al. [143] beschrieben und vorerst als direkte Methode eingeführt [144, 149]. In den folgenden Jahren wurden dann die sensitiveren indirekten Immunfluoreszenzmethoden, zunächst als Zweischicht- [150] und später auch als Mehrschichtmethode [151], entwickelt.

Da Fluoreszenzfarbstoffe relativ instabil sind, ist eine sachgemäße Lagerung (bei Temperaturen  $\leq 4^{\circ}\text{C}$ , unter Luftabschluss und trocken) notwendig. Heutzutage ist eine große Auswahl an Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsspektren verfügbar. Beispielhaft zu nennen sind das grün-gelb fluoreszierende Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das rot fluoreszierende Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) und das ebenfalls rot fluoreszierende Texas Red.

Das fluoreszierende Signal setzt sich scharf begrenzt vom dunklen Hintergrund ab, so dass sich auch sehr feine Strukturen präzise darstellen lassen. Weitere Vorteile der Immunfluoreszenz sind die hohe Empfindlichkeit, die große Anwendungsbreite sowie die Schnelligkeit und Einfachheit der Anwendung [152].

Bei der Immunenzymtechnik werden Enzyme als Markersubstanz verwendet. In der Arbeit von *Nakane* und *Pierce* [153] wurden mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelte Antikörper erstmalig zur Detektion von Gewebean antigenen genutzt. Durch die histochemische Darstellung des Enzyms wurde der AG-AK-Komplex direkt sichtbar gemacht (direkte Methode). Um auch bei einer nur geringen Menge antigenen Strukturen ein

ausreichend starkes Signal zu erhalten, wurde neben der direkten Methode, die sensitivere indirekte Immunenzymtechniken entwickelt [154]. Neben der Meerrettichperoxidase (HRP) hat sich auch die Alkalische Phosphatase (AP) als Markerenzym bewährt. Seltener kommen hingegen Betagalaktosidase oder Glukoseoxidase zum Einsatz [155].

Die chemische Konjugation des recht großen Enzymmoleküls an den primären (direkte Methode) oder sekundären Antikörper (indirekte Methode) kann teilweise zum Funktionsverlust des konjugierten Enzyms führen. Um den Problemen der chemischen Konjugation zu entgehen, können die antigenen Eigenschaften des verwendeten Enzyms genutzt werden. Hierfür beispielhaft zu nennen sind die Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode [156] sowie die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode [155]. Vorteile dieser Methoden gegenüber der indirekten Methode sind die höhere Sensitivität sowie eine ausgeprägtere Signalverstärkung. Der Primär-AK kann demzufolge höher verdünnt und dadurch ungewollte Hintergrundfärbungen vermieden werden [157].

Um die Sensitivität einer Immunenzymreaktion weiter zu steigern, müssen mehr Enzymmoleküle an einer Antigenbindungsstelle lokalisierbar sein [155, 158]. Dies lässt sich mit der (Strept-)Avidin-Biotin-Komplex-Methode [159] sowie der Labeled-(Strept-)Avidin-Biotin-Methode [160] realisieren. Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass endogenes Biotin im Gewebe zu unspezifischen Bindungen führen und dadurch eine ungewollte Hintergrundfärbung verursachen kann.

Für jedes zur Anwendung kommende Enzymsystem sind verschiedene chromogene Substrate zur histochemischen Darstellung verfügbar.

Unabhängig von der verwendeten Methode ergeben sich bei Immunenzymtechniken spezifische Probleme. Im Gegensatz zu Fluoreszenzfarbstoffen oder partikulären Materialien benötigen Enzyme definierte Reaktionsbedingungen. So ist die enzymatische Aktivität abhängig vom pH-Wert, der Ionenkonzentration des Puffermilieus sowie von der Temperatur. Weiterhin bedarf es bei der Anwendung von Immunenzymtechniken der vorherigen Blockierung endogener Enzymaktivität (v.a. bei der Anwendung von Peroxidase oder Alkalischer Phosphatase).

## 2.9 „Tissue Printing“

Mit „Tissue Printing“ wird im Allgemeinen ein Verfahren bezeichnet, bei dem die Schnittfläche eines Gewebepreparates auf eine geeignete aufnahmefähige Oberfläche (Printmedium, Printräger) appliziert wird. Der dadurch entstehende Gewebeabdruck dient dem Nachweis und der Lokalisation von gewebespezifischen Proteinen, Nukleinsäuren und Kohlenhydratabschnitten [161].

### 2.9.1 Vergleich von Nachweismethoden für Proteine

Zur differentiellen Detektierung von Proteinen hat sich die Western-Blotting-Methode als weit verbreitetes Nachweisverfahren etabliert. Der Proteintransfer von Polyacrylamid-Gelen auf Trägermembranen wurde erstmalig 1979 durch *Renart et al.* [162] (Verwendung von Diazobenzoyloxymethyl-Papier als Trägermatrix) und *Towbin et al.* [163] (Verwendung von Nitrocellulosemembranen als Trägermatrix) beschrieben. Durch die Immobilisierung der Proteine auf der Membranoberfläche können diese nicht mehr abdiffundieren und sind somit optimal für verschiedenste Detektierungsverfahren zugänglich. Zuvor müssen jedoch die zum Teil umständlichen und zeitaufwendigen Prozesse der Proteindenaturierung, elektrophoretischen Aufspaltung und Renaturierung der Proteine durchlaufen werden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass keine Aussagen über die anatomische oder zelluläre Lokalisation von Proteinen bzw. deren unterschiedlicher Verteilung innerhalb eines Gewebes getroffen werden kann.

Mit histochemischen und immunzytochemischen Färbemethoden von Gewebeschnitten ist hingegen ein Nachweis verschiedenster Proteine unter Erhaltung der anatomischen Lokalisation möglich. Die Nachteile dieser Verfahren ergeben sich jedoch aus der zumeist nötigen Fixierung des Gewebes. Die dadurch bedingte Konformationsänderung und negative Beeinflussung des Löslichkeitsverhaltens der Proteine führt zu einer verminderten Nachweisfähigkeit von bestimmten Antigenen oder Enzymen. Des Weiteren kann es im Verlauf des Fixierprozesses zur sog. „Substanzflucht“ (Verlagerung zytoplasmatischer Bestandteile durch die eindringende Front des Fixiermittels) kommen [112]. Die Fixierung bewahrt zwar im Allgemeinen die Zellmembranstruktur, erschwert aber gleichzeitig die Penetration der zum Teil großen immunhistochemischen Marker [164].

Die Methodik des direkten Proteintransfers von einem Gewebe auf eine Trägermembran („Tissue Printing“) kombiniert die Vorteile beider Verfahren. Wie beim Western-Blot sind die auf der Trägermatrix immobilisierten Proteine für eine Vielzahl von Nachweismethoden bestmöglich zugänglich. Gleichzeitig wird aber auch, wie bei der Anfärbung von Gewebeschnitten, die histologische Lokalisation der Proteine bewahrt.



Weitere Vorteile des „Tissue Printings“ sind, dass sich verschiedenste Proteintypen (zytosolische, zytoskelettale sowie membrangebundene Proteine) unabhängig von ihrem Molekulargewicht darstellen lassen und dass eine große Anzahl möglicher Prints erzielt werden kann. Außerdem ermöglicht das „Tissue Printing“ ein natives Belassen der Gewebe. Die kostengünstige, schnelle und recht einfache Durchführbarkeit sowie die hohe gewebespezifische Variabilität der Printtechnik stellen weitere Vorzüge des „Tissue Printing“-Verfahrens dar.

## 2.9.2 Entwicklung und Prinzipien des „Tissue Printing“-Verfahrens

*Daoust* veröffentlichte 1957 die erste aus einer Reihe von Arbeiten, in denen Gewebeabdrücke von Gefrierschnitten diverser tierischer Organe (Leber, Niere, Pankreas und Darm) auf verschiedensten Printrägern (Gelatine-, Gelatine-DNA- oder Stärke-behaftete Oberflächen) angefertigt und diese bezüglich der Lokalisation von Proteasen, Amylasen, RNasen und DNasen untersucht wurden [165, 166]. Auch *Gaddum und Blandau* verwendeten 1973 bei ihren Studien zur proteolytischen Aktivität von Spermatozoen verschiedener Säugetierspezies ein Gelatine-tragendes Printmedium [167].

Erst in den folgenden Jahren wurden Membranen (aus z.B. Polyamid 6.6 (Nylon), Polyvinylidenfluorid oder Nitrocellulose) entwickelt, die in der Lage waren, sowohl Proteine und Nukleinsäuren zu binden als auch deren laterales Abdriften auf dem Printräger zu minimieren. Dadurch konnte nach der Durchführung entsprechender Detektierungsverfahren die subzelluläre Auflösung optimiert werden. So wurde beispielsweise die Eigenschaft von Proteinen an Nitrocellulosemembranen zu binden 1986 von *Seshi* [168] zur Charakterisierung von Zellkulturen genutzt und das Verfahren als „Cell Blotting“ bezeichnet.

*Cassab und Varner* [169] prägten 1987 erstmalig den Begriff „Tissue Printing“. Sie fertigten zur immunhistochemischen Untersuchung von Samenschalen der Sojabohne Gewebeabdrücke auf einer Nitrocellulosemembran an, um mit entsprechenden Antikörpern das Zellwandprotein Extensin zu lokalisieren. Da dieses Verfahren eine verlässliche und schnelle Proteinlokalisierung unter Einbeziehung vieler anatomischer Details ermöglichte, wurde es in darauffolgenden Untersuchungen an pflanzlichen Geweben zur Lokalisierung vieler weiterer Zellwandproteine (z.B.: hydroxyprolinreiche Glykoproteine [170, 171]; glycinreiche Proteine [171]), zytoplasmatischer Proteine (z.B.: mitochondriale Proteine [172]) und Enzyme (z.B.: Peroxidase [173]; Cellulase [174]) genutzt.

Neben der Detektierung von Proteinen und Enzymaktivitäten können „Tissue Prints“ auch auf Nukleinsäuren hin untersucht werden. *Varner et al.* [175] modifizierten das von *Cassab und Varner* beschriebene Verfahren und etablierten die Methodik der „Tissue Print“-Hybridisierung, indem sie die mRNA von Extensin und  $\beta$ -Conglycinin in Sojabohnenschalen und -samen mittels  $^{32}\text{P}$ -markierten DNA-Fragmenten lokalisierten.

Nahezu alle pflanzlichen Gewebe hinterlassen, bedingt durch die feste Struktur der Zellwände, bei Druckeinwirkung ein dreidimensionales Relief im Printmedium (vor allem bei der Verwendung von Nitrocellulosemembranen oder Agarosegelen). Dieser so genannte physikalische Gewebeabdruck kann mittels Auflicht bei geringer Vergrößerung untersucht werden. Zusätzliche anatomische Details lassen sich jedoch besser unter Verwendung einer schräg zum Objektisch des Mikroskops einfallenden Lichtquelle darstellen [174, 176]. Zur Dokumentation eignen sich stereomikroskopische oder makrofotografische Aufnahmen, welche bei der Beurteilung des chemischen Prints hilfreiche zusätzliche Informationen zur histologischen Lokalisation der detektierten Makromoleküle liefern.

Chemische „Tissue Prints“ resultieren aus dem in drei wesentlichen Schritten ablaufenden Molekültransfer von der Oberfläche des Gewebeschnittes auf den Printträger. Zuerst erfolgt die Freisetzung der Proteine oder anderer interessierender Makromoleküle aus dem Gewebeverband. Bei lückenlosem Kontakt zwischen angeschnittener Gewebeoberfläche und Printmedium erfolgt nun die Diffusion der Proteine. Zuletzt werden dann die Proteine in der Matrix des Printmediums gebunden und immobilisiert [176].

Im Gegensatz zum chemischen Print, der unabhängig von der Festigkeit des Gewebes entsteht, wird ein physikalischer Gewebeabdruck in einer Printmembran nur durch solide Gewebe erzeugt. Aus diesem Grund wurden bei „Tissue Prints“ von tierischen Geweben, wegen der im Vergleich zu Pflanzen weichen Struktur, lange Zeit keine Membranen als Printmedium angewendet. 1986 fanden dann erstmalig mit der Arbeit von *Lipkin und Oldstone* [177] Membranen als Printträger Verwendung beim „Tissue Printing“ tierischer Gewebe. In dieser Arbeit wurden Gefrierschnitte von Mäusekörpern auf Nylonmembranen „geblottet“, die anschließend zur Lokalisierung spezifischer Antigene immunhistochemisch gefärbt wurden. *Hernandez et al.* [178] verwendeten ebenfalls Nylonmembranen als Printträger. Bei dieser Arbeit wurden Gefrierschnitte von murinem und humanem Hirngewebe verwendet, deren „Tissue Prints“ auf das Vorhandensein multipler DNA-Kopien hin untersucht wurden. Die Eignung weiterer Membrantypen für das Durchführen von „Tissue Prints“ mit tierischen Geweben wurde 1991 u.a. in der Arbeit von *McGrath et al.* erprobt [179]. Es wurden sowohl Nylon-, Polyvinylidenfluorid- als auch Nitrocellulosemembranen verwendet, um bestimmte Rezeptorproteine immunhistochemisch anzufärben.

Obwohl das Verfahren des direkten Proteintransfers von einem Gewebe auf eine Trägermembran bereits in einer Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten Anwendung fand, herrscht bezüglich der Begriffsbestimmung zum Teil noch Uneinigkeit. So wird in der Arbeit von *Okabe et al.* [164] beispielsweise von „In situ Blotting“ gesprochen. Hierbei erfolgt der Proteintransfer von unfixierten Gefrierschnitten auf eine Blottingmembran allein durch

Permeation beim Auftauen des Gewebes. Da dabei kein Druck auf das Präparat ausgeübt werden muss, erachten die Autoren den Begriff „Tissue Printing“ für ihre Art der Durchführung als nicht geeignet. Um zu betonen, dass neben diversen Makromolekülen auch ganze Zellschichten einer Präparatschnittfläche auf eine Printmembran transferiert werden können, sprechen *Matyas et al.* [180] und *McDonald et al.* [181] von „Tissue Transfers“.

In der hier vorliegenden Arbeit wird nun einheitlich der Begriff „Tissue Printing“ verwendet.

### 3 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit hatte sich die Optimierung der von *Herrmann et al.* [27, 28] entwickelten neuartigen und schonenden Gefrierschliffmethode zur Untersuchung der Strukturintegrität von nativen, besonders empfindlichen humanen Kryofelsenbeinpräparaten zum Ziel gesetzt. Das Verfahren sollte dahingehend optimiert werden, dass von den Gefrierschliffen eine beliebige Anzahl „Tissue Prints“ angefertigt werden kann, wobei sowohl die physikalischen als auch chemischen Prints gut beurteilbar sein sollen. Weiterhin sollten immunhistochemische Methoden auf ihre Eignung hin überprüft werden gewebespezifische Substanzen auf dem Printmedium nachzuweisen, um eine Darstellung der cochleären Strukturintegrität zu ermöglichen.

Bisher erfolgen histologische Untersuchungen zur cochleären Feinstruktur meist an eingebetteten Präparaten. Die dafür notwendige Probenvorbereitung führt zu präparationsbedingten Artefakten. Um cochleäre Traumata, die beispielsweise durch Elektrodeninsertionen verursacht wurden, beurteilen zu können, ist daher eine schonende Probenpräparation von möglichst nativen Präparaten notwendig.

Mit der Verwendung von kryofixierten, uneingebetteten Felsenbeinpräparaten und der Anwendung einer Gefrierschliffmethode, bei der im Gegensatz zur Schnittpräparation keine Materialverluste (Sägeblattbreite etc.) sowie Verformungen auftreten, werden diese Ansprüche erfüllt.

Es wurden folgende Ziele und Fragestellungen in dieser Arbeit untersucht:

- Kann mittels der optimierten Kryoschleifvorrichtung eine Fixierung und kontinuierliche Kühlung sowohl während der Schliffpräparation als auch während des „Tissue Printings“ gewährleistet werden?
- Können gut beurteilbare physikalische „Tissue Prints“ hergestellt werden?
- Ist das „Tissue Printing“-Verfahren auch mit in-situ liegender CI-Elektrode durchführbar?
- Ist trotz der kontinuierlichen Kühlung, welche für den Strukturerhalt innerhalb des Felsenbeinpräparates nötig ist, ein Proteinübergang auf den Printräger möglich?
- Ist mit Immunfluoreszenztechniken der Nachweis der auf den Printräger transferierten Proteine (Kollagen Typ IV und Connexin 26) möglich, und kann dieser mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes erbracht werden?
- Welche Kollagen Typ IV-Konzentration auf dem Printräger ist mindestens nötig, damit eine Darstellung mittels Immunfluoreszenztechnik möglich ist?

- Ist mit dem „Tissue Printing“-Verfahren eine detaillierte Aussage über den Erhalt der cochleären Membranintegrität möglich?
- Ist die Mikro-Computertomographie ein geeignetes Verfahren zur orientierenden Beurteilung cochleärer Feinstrukturen?

### **3.1 Ermittlung der unteren Nachweisgrenze für fluoreszenz-mikroskopisch detektierbares Kollagen Typ IV**

Um die cochleäre Strukturintegrität zu beurteilen, wurden in der vorliegenden Studie Connexin 26 und Kollagen Typ IV in „Tissue Prints“ von Gefrierschliffen kryofixierter humaner Felsenbeinpräparate nachgewiesen. Das Protein Kollagen Typ IV ist ein wesentlicher Bestandteil von Basalmembranen und eignet sich daher besonders gut zur Darstellung cochleärer Membranstrukturen.

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Verfahren des „Tissue Printings“ beinhaltet den Proteintransfer von der Gefrierschliffebene des Felsenbeinpräparates auf einen Printträger. Anschließend erfolgt der immunhistochemische Nachweis des transferierten Proteins mittels indirekter Immunfluoreszenz. Für die Interpretation der Ergebnisse ist die Kenntnis der Proteinkonzentration, die fluoreszenzmikroskopisch unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) gerade noch detektiert werden kann, von Bedeutung. In Vorversuchen wurde diese untere Nachweisgrenze unter Verwendung biochemisch gereinigten Kollagens Typ IV, welches in definierten Konzentrationen auf die in der Studie verwendeten Printmembranen aufgetragen wurde, ermittelt.

Da die Konzentration in Gruppen von vorab definierten Verdünnungen eingeteilt wurde, ist die Analyse als semiquantitativ einzuordnen. Durch den abschließenden qualitativen Vergleich der sich einstellenden Intensitäten des Fluorchroms konnte ein Rückschluss auf die Konzentration des Kollagen Typ IV auf der Printmembran gezogen werden.

Da die Intensität des Fluoreszenzsignals nicht nur von der Konzentration der aufgetragenen Verdünnung, sondern auch von deren flächenhafter Ausbreitung auf dem Printträger abhängig ist, musste eine flächenbegrenzende Vorrichtung geschaffen werden, die im Folgenden als Printträgerfassung bezeichnet wird.

#### **3.1.1 Konstruktive Auslegung der Printträgerfassung**

Um die Ausbreitungsfläche der aufgetragenen Verdünnung definiert zu begrenzen, wurde eine Vorrichtung konstruiert, in die der Printträger eingefasst werden konnte. Sie bestand aus zwei aus Polytetrafluorethylen (PTFE) gefertigten Bauteilen, welche die Form eines

kurzen Rohres mit endständiger ringförmiger Verbreiterung aufwies. Durch den Innendurchmesser von 10 mm wurde eine definierte Kreisfläche von 78,5 mm<sup>2</sup> erzielt. Die Fixierung beider Bauteile mit der darin einfassbaren Printmembran erfolgte mittels sechs symmetrisch verteilter Schrauben. Eine Aufsichtsdarstellung dieser Printträgerfassung ist in Abbildung 4 dargestellt.

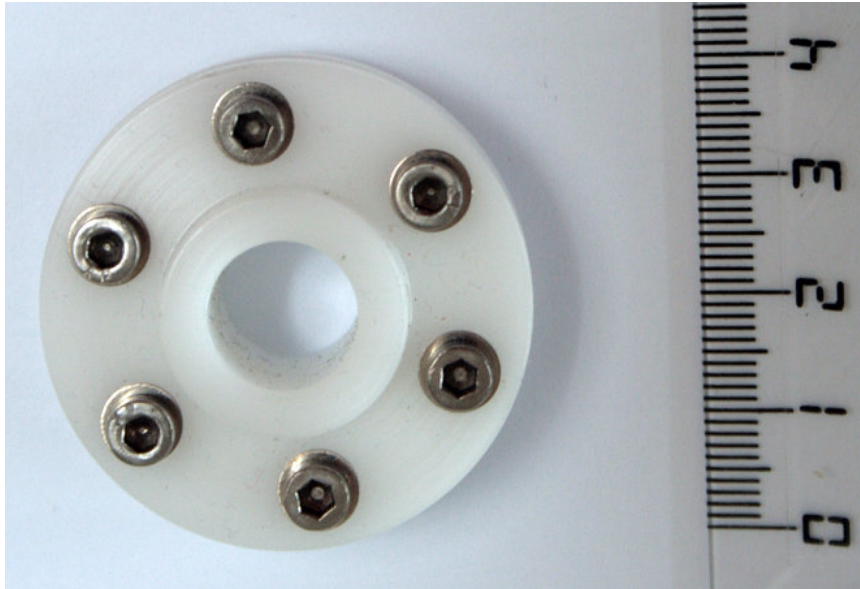


Abbildung 4: Aufsichtsdarstellung der Printträgerfassung

### **3.1.2 Versuchsdurchführung zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze für fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Kollagen Typ IV**

Um die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Untersuchung der späteren „Tissue Prints“ zu gewährleisten, wurden für die Ermittlung der unteren Nachweisgrenze für fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Kollagen Typ IV die Reaktionsbedingungen sowie Materialien und Nachweisreagenzien entsprechend der im Hauptteil der Studie verwendeten Methode ausgewählt.

Zu Beginn des Versuchs wurde die Kollagen Typ IV-Stammlösung (human Collagen Type IV, Konzentration 300 µg/µl, Sigma-Aldrich, USA) mit 40%iger Glycerollösung (Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz) versetzt und eine Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$ ) aufgestellt. Tabelle 5 zeigt die Endkonzentrationen der einzelnen Verdünnungsschritte anhand der Ausgangskonzentration der Kollagen Typ IV-Stammlösung. Das Endvolumen pro Verdünnung betrug 100 µl. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich ein Ansatz gleichen Endvolumens aus phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS, Sigma-Aldrich, USA) und 40%iger Glycerollösung hergestellt.

Tabelle 5: Verdünnungsreihe mit entsprechenden Kollagen Typ IV-Endkonzentrationen

Verdünnung	Konzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]
$10^{-1}$	30,0
$10^{-2}$	3,0
$10^{-3}$	0,3
$10^{-4}$	0,03
$10^{-5}$	0,003
$10^{-6}$	0,0003

10  $\mu\text{l}$  Lösung der jeweiligen Kollagen Typ IV-Verdünnungen sowie der Negativkontrolle sollten anschließend separat auf die Optitran™-verstärkten Nitrocellulosemembranen (Optitran BA-S 83, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) aufgetragen werden. Hierfür mussten die Membranen zunächst zurechtgeschnitten werden ( $\varnothing$  ca. 13 mm), um sie anschließend nacheinander einzeln in die Printrägerfassung einzupassen. Nach dem jeweiligen Auftragen der 10  $\mu\text{l}$  Lösung wurden die Nitrocellulosemembranen aus der Printrägerfassung entfernt und zum Trocknen für 1h bei Raumtemperatur (RT) in 12er-Wellplatten (BD Biosciences Germany, Heidelberg) überführt.

Nach der Trocknung der Membranen erfolgte die Anfärbung des Kollagen Typ IV mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz.

Während der gesamten Durchführung der immunhistochemischen Färbung wurden die Nitrocellulosemembranen in den einzelnen Wellkammern belassen. Um die einzelnen Waschgänge und Inkubationen zu optimieren, wurde die 12er-Wellplatte auf einer Schüttelplatte fixiert. Der Ablauf der Färbeprozedur ist in Tabelle 6 und die Beschreibung der einzelnen Chemikalien und Lösungen ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Nach der abschließenden Waschprozedur wurden die präparierten Nitrocellulosemembranen einzeln zur qualitativen Auswertung unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM FluoView FV1000, Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) auf gereinigte Objektträger aufgebracht. Um ein Austrocknen der Membranen zu verhindern, wurde ein Tropfen PBS-Lösung auf die Membranen gegeben, welche anschließend mit einem Deckgläschen bedeckt wurden.

Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 519 nm konnte das Kollagen Typ IV unter dem CLSM dargestellt werden.

Tabelle 6: Immunhistochemische Färbung der mit humanem Kollagen Typ IV-Verdünnungen benetzten Nitrocellulosemembranen sowie ausgewählter „Tissue Prints“

	Arbeitsschritt	Chemikalien/ Lösungen	Menge pro Well- kammer	Zeit	Reaktionsbedingungen
1	Waschprozedur	PBS-Lösung	1000 µl	3 x 5 min	RT, Schüttelplatte
2	PBS-Lösung aus Well entfernen				
3	Inkubation	Blockierungslösung	980 µl	1 h	RT, Schüttelplatte
4	Inkubation	Primärer AK	20 µl	12 h	4°C (Kühlschrank), Schüttelplatte
5	Blockierungslösung + Primären Ak zur Wiederverwertung aus Wellkammer entfernen, in einen Falcon überführen und bei 4°C im Kühlschrank lagern				
6	Waschprozedur	PBS-Lösung	1000 µl	3 x 5 min	RT, Schüttelplatte
7	PBS-Lösung aus Well entfernen				
8	Inkubation	Blockierungslösung	995 µl	30 min	RT, Schüttelplatte
7	Inkubation	Sekundärer AK	5 µl	1 h	RT, Schüttelplatte, unter Lichtausschluss
8	Blockierungslösung + Sekundären AK zur Wiederverwertung aus Wellkammer entfernen, in einen vor Licht geschützten Falcon überführen und bei 4°C im Kühlschrank lagern				
9	Waschprozedur	PBS-Lösung	1000 µl	3 x 5 min	RT, Schüttelplatte, unter Lichtausschluss



Tabelle 7: Chemikalien und Lösungen für die immunhistochemische Färbung der mit humanem Kollagen Typ IV-Verdünnungen benetzten Nitrocellulosemembranen sowie ausgewählter „Tissue Prints“

Chemikalien/ Lösungen	Verwendetes Produkt	Erläuterung/ Funktion
Blockierungslösung	Antibody Diluent (BD Biosciences Germany, Heidelberg)  [gebrauchsfertiger Natriumphosphatpuffer, der bovines Serumalbumin und Ziegen-Serum beinhaltet]	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Blockierung der unspezifischen Bindungen des primären AK und Verdünnung der Stammlösung des primären AK in einem Verhältnis 1:50</li> <li>– Blockierung der unspezifischen Bindungen des sekundären AK und Verdünnung der Stammlösung des sekundären AK in einem Verhältnis 1:200</li> </ul>
Primärer AK	mouse anti-collagen Type IV COL4A (Santa Cruz Biotechnology, USA)  [Konzentration der Stammlösung: 0,1 mg/ml]	<ul style="list-style-type: none"> <li>– monoklonaler AK gegen humanes Kollagen Typ IV</li> </ul>
Sekundärer AK	Alexa Fluor 488 goat anti- mouse IgG (Invitrogen Germany, Darmstadt)  [Konzentration der Stammlösung: 2 mg/ml]	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Fluorchrom-konjugierter AK gegen mouse IgG</li> </ul>
PBS-Lösung	phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich, USA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Entfernung nicht bindender AK im Anschluss an die Inkubation</li> </ul>

### 3.1.3 Ergebnisse der Ermittlung der unteren Nachweisgrenze für fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Kollagen Typ IV

Die Abbildung 5 zeigt exemplarisch Ergebnisse der qualitativen Darstellung von Kollagen Typ IV auf Nitrocellulosemembranen. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Verdünnung des Kollagen Typ IV die Intensitäten des Fluoreszenzsignals abnahm. Anhand der Untersuchung mit dem konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop CLSM-FluoView FV1000 konnte bis zu einer Verdünnung von  $10^{-5}$  ein Fluoreszenzsignal, wenn auch von sehr geringer Intensität, detektiert werden. Bei einer Konzentration der Stammlösung von 300  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  entsprach dies einer absoluten Kollagen Typ IV-Konzentration von 0,003  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (siehe Tabelle 5 des Kapitels 3.1.2), die somit gerade noch mittels indirekter Immunfluoreszenz unter dem CLSM nachweisbar war.

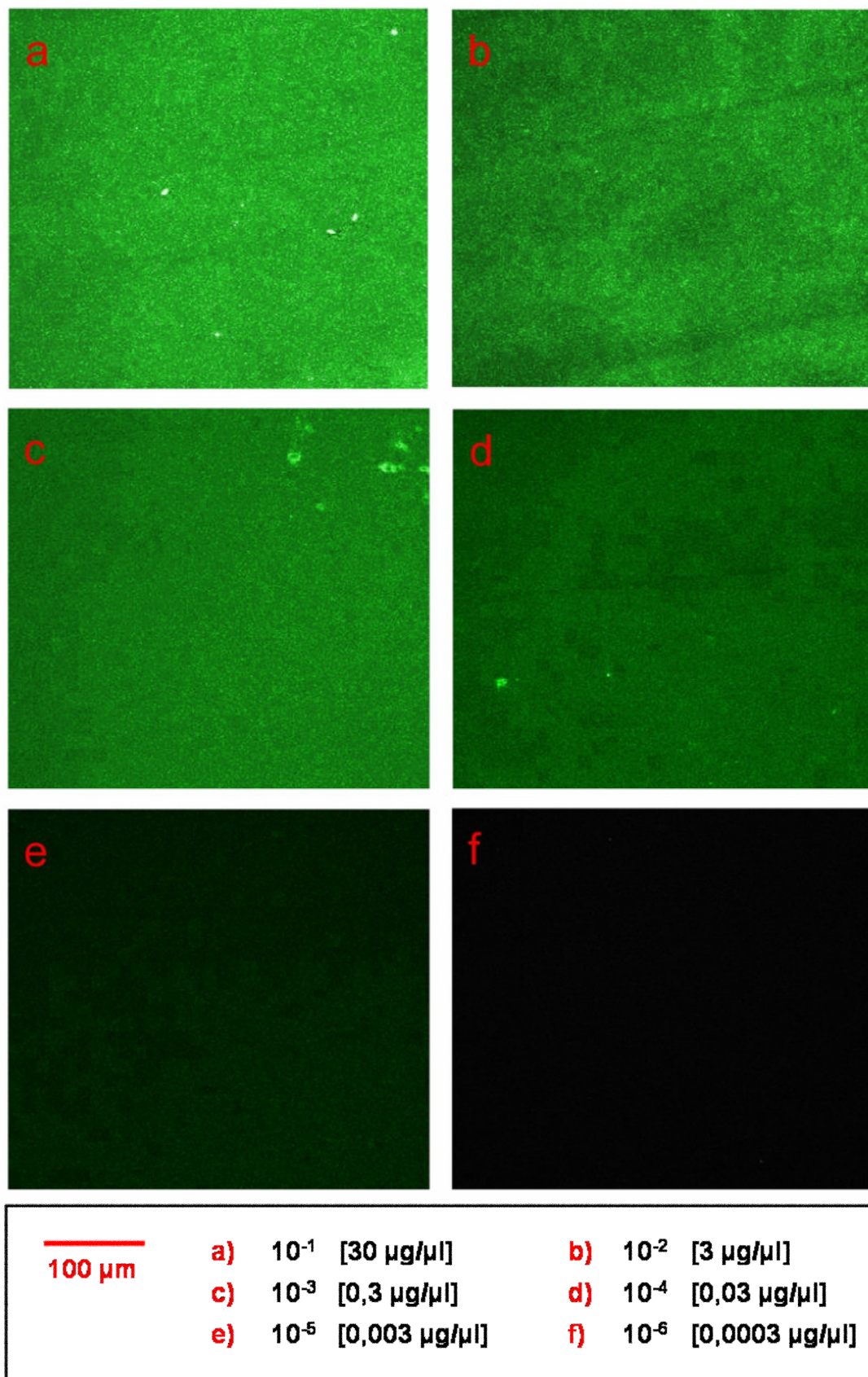


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Detektierung der Kollagen Typ IV-Verdünnungsreihe

Bei der parallel mitgeführten Negativkontrolle, auf die kein Kollagen Typ IV aufgetragen wurde, war kein Fluoreszenzsignal zu detektieren. Das heißt, dass es durch die verwendeten Antikörper zu keiner unspezifischen Reaktion mit der Nitrocellulosemembran gekommen ist. Daraus lässt sich umgekehrt folgern, dass der Primär-AK spezifisch an Kollagen Typ IV-Moleküle gebunden hat, welche durch die anschließende Inkubation mit dem Fluorchrom-konjugierten Sekundär-AK zur Darstellung gebracht werden konnten.

## 3.2 Felsenbeinpräparate

Es wurden zwei native humane Felsenbeine verwendet, welche durch das Institut für Anatomie der Universität Rostock zur Verfügung gestellt wurden. Die Felsenbeine wurden mittels einer Feinsäge so weit getrimmt, dass jeweils ein zylindrisches Präparat mit einem Durchmesser von ca. 10 – 12 mm erzeugt wurde, in welchem sich die uneröffnete Cochlea befand.

Nach erfolgter Trimmung wurde mittels eines hochauflösenden Mikro-Computertomographen (SkyScan 1172 HR micro-CT, Aartselaar, Belgien) von den Felsenbeinpräparaten jeweils ein vollständiges Tomogramm angefertigt. Anschließend wurden die Felsenbeinpräparate in 0,9%ige NaCl-Lösung überführt und tiefgekühlt bei -21°C in einem Gefrierschrank (Liebherr, Bulle, Schweiz) gelagert.

Die zylindrischen Felsenbeinpräparate wurden daraufhin jeweils in die Fixierungshülse der Kryoschleifvorrichtung (KSV) eingepasst. Aufgrund der z.T. bestehenden Inkongruenz des Präparates zur Hülse erfolgte eine Wasserauffüllung der Fixierungshülse mit nachfolgender Zwischenfrierung bei -21°C, um eine kontinuierliche Fixierung während des gesamten Versuchsdurchlaufes zu gewährleisten. Die in die Kryoschleifvorrichtung eingesetzten Präparate verblieben jeweils bis zum Abschluss der gesamten Untersuchung in der Kryoschleifvorrichtung.

Vom Präparat A wurde zunächst mittels der Kryoschliffpräparation so viel Material abgetragen, bis die basale Schneckenwindung deutlich darstellbar war. Danach wurde das Felsenbeinpräparat kurz angetaut, damit die Insertion einer Simulations-Elektrode in die Scala tympani erfolgen konnte, und anschließend sofort wieder bei -21°C tiefgekühlt. Es sollte im Folgenden an diesem Präparat untersucht werden, ob das „Tissue Printing“-Verfahren auch mit in-situ liegender Elektrode durchführbar ist.

Tabelle 8 zeigt eine Übersicht über die Verwendung und Versuchsabläufe der untersuchten zwei Felsenbeinpräparate A und B.

Tabelle 8: Übersicht der untersuchten Felsenbeinpräparate („+“ = durchgeführt; „-“ = nicht durchgeführt)

	Präparat	
	A	B
Verwendung	Vorversuche zur Maximierung der Anpresszeit	Verfahrensoptimierung
CI-Elektrodeninsertion	+	-
Gefrierschliffpräparation	+	+
Verwendete Kryoschleifvorrichtung (KSV)	von <i>Herrmann et al.</i> [27, 28] entwickelte KSV (Typ I)	Prototyp einer neuen KSV (Typ II) und deren optimierte Version
Anzahl der „Tissue Prints“ [Nr.]	27 [Nr. 1 - 27]	46 [Nr. 28 - 73]
Immunhistochemische Färbung der „Tissue Prints“	-	+
Dokumentation:		
- Micro-CT (Skyscan X-Ray Microtomograph)	+	+
- Stereomikroskop (Zeiss) mit aufgesetzter Digitalkamera (Canon)	+	+
- Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM-FluoView FV1000, Olympus)	-	+

### 3.3 Kryoschleifvorrichtung

#### 3.3.1 Kryoschleifvorrichtung vom Typ I

In den Arbeiten von *Herrmann et al.* [27, 28] wurde eine Kryoschleifvorrichtung (KSV) beschrieben, die als Grundkörper aus einem nach oben geöffneten Messingbecher bestand. Der Messingbecher ermöglichte eine Auffüllung mit einem Kühlmittel. Ein über den Messingbecher gesetzter Polytetrafluorethylen (PTFE)-Schutzbecher mit Entlüftungsöffnungen diente der Isolierung, um ein manuelles Arbeiten im Temperaturbereich unter 0°C zu ermöglichen. In den Boden des Messingbechers war eine nach oben geöffnete Messinghülse (Fixierungshülse) mit einem Innendurchmesser von 12 mm eingelassen, in die das entsprechende Knochenpräparat eingepasst wurde. In das Innengewinde der Hülse war oberhalb des Präparates eine Nachstellschraube aus Messing eingepasst. In die obere Deckschicht der Nachstellschraube wurden Teilstriche in einer Winkelteilung von 18° eingefräst, womit aufgrund der gewählten Gewindesteigung ein exakter Präparatvorschub in

50 µm-Schritten möglich war. Der Vorschub erfolgte mit Hilfe eines Schlitzschraubendrehers, für den mittig der Deckplatte eine Kerbe eingefräst war.

Mit Hilfe dieser Kryoschleifvorrichtung vom Typ I wurde in der vorliegenden Arbeit die Gefrierschliff-präparation von Felsenbein A durchgeführt. Es bestätigten sich bei der Anwendung die bereits von *Herrmann et al.* [111] genannten Nachteile dieser KSV:

- Während des Schleifens erfolgten durch den nicht fixierten PTFE-Schutzbecher ungewollte Rotationsbewegungen des Messingbechers,
- Infolge der kontinuierlichen Flüssigkeitseinwirkung auf die KSV beim Schleifvorgang bildete sich während des Zwischenfrierens Eis zwischen dem Messingbecher und dem PTFE-Schutzbecher, was das Ablösen des Schutzbechers vor jeder Kühlmittelauffüllung erschwerte,
- Der PTFE-Schutzbecher musste vor jedem Präparatvorschub entfernt werden, wodurch eine kontinuierliche Isolierung des Kühlmittels nicht gewährleistet werden konnte.

### 3.3.2 Prototyp einer weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung (Typ II)

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Prototyp einer neuen Kryoschleifvorrichtung entwickelt und gefertigt, mit dem die vorgenannten Nachteile nicht mehr auftraten. Dieser Prototyp einer weiterentwickelten KSV (Typ II) wurde zur Gefrierschliffpräparation des Felsenbeinpräparates B genutzt und ist in verschiedenen Ansichten in Abbildung 6 dargestellt.

Bei der Konstruktion des Prototyps wurden folgende Basiselemente der KSV vom Typ I nahezu unverändert beibehalten:

- Grundkörper aus einem nach oben geöffneten Messingbecher, in den das Kühlmittel gefüllt werden konnte,
- Fixierungshülse (Ø 12 mm) mit Innengewinde, in die das entsprechende Knochenpräparat sowie eine Nachstellschraube aus Messing eingepasst wurde.

Um sowohl die unerwünschten Bewegungen zwischen Messingbecher und PTFE-Schutzbecher als auch das Eindringen von Flüssigkeit in den dazwischen liegenden Hohlraum zu verhindern, wurde zur Isolierung anstelle des Schutzbechers ein Ring aus PTFE am Messingbecher mit Schrauben fixiert. Die obere Öffnung des Messingbechers wurde mit einem leicht abnehmbaren Deckel aus PTFE mit Entlüftungsöffnungen verschlossen. In der Mitte des Deckels bestand eine größere Öffnung, durch die hindurch die

Nachstellschraube, welche deutlich länger als in der KSV vom Typ I war, nach außen geführt wurde. Neben Messingbecher und PTFE-Deckel wurde ein drittes Grundelement gefertigt, welches den Stellring der KSV bildete. In diesen aus PTFE gefertigten und ebenfalls mit Entlüftungsöffnungen ausgestatteten Stellring war mittig eine kleine Hülse aus Messing eingepasst, die exakt das obere Ende der Nachstellschraube aufnehmen konnte. Eine horizontal von außen durch die kleine Messinghülse gedrehte Schraube endete mit etwas Überstand im Inneren der Hülse, so dass eine Nut entstand. Beim Aufsetzen des PTFE-Stellringes auf den Messingbecher mit Nachstellschraube, passte diese Nut exakt in eine Kerbe, welche seitlich in das außen liegende obere Ende der Nachstellschraube eingefräst war. Durch die somit gewährleistete kraftschlüssige Verbindung von Nachstellschraube und PTFE-Stellring konnte ein Präparatvorschub bei geschlossener PTFE-Isolierung erfolgen. Damit es durch die beim Versuch herrschenden Temperaturen von bis zu  $-78,5^{\circ}\text{C}$  nicht zur Eisbildung zwischen innerer Messinghülse und oberem Ende der Nachstellschraube kam, welche ein Lösen beider Komponenten erschweren könnte, wurde ein kleiner Ring aus PTFE in die Hülse eingepresst.

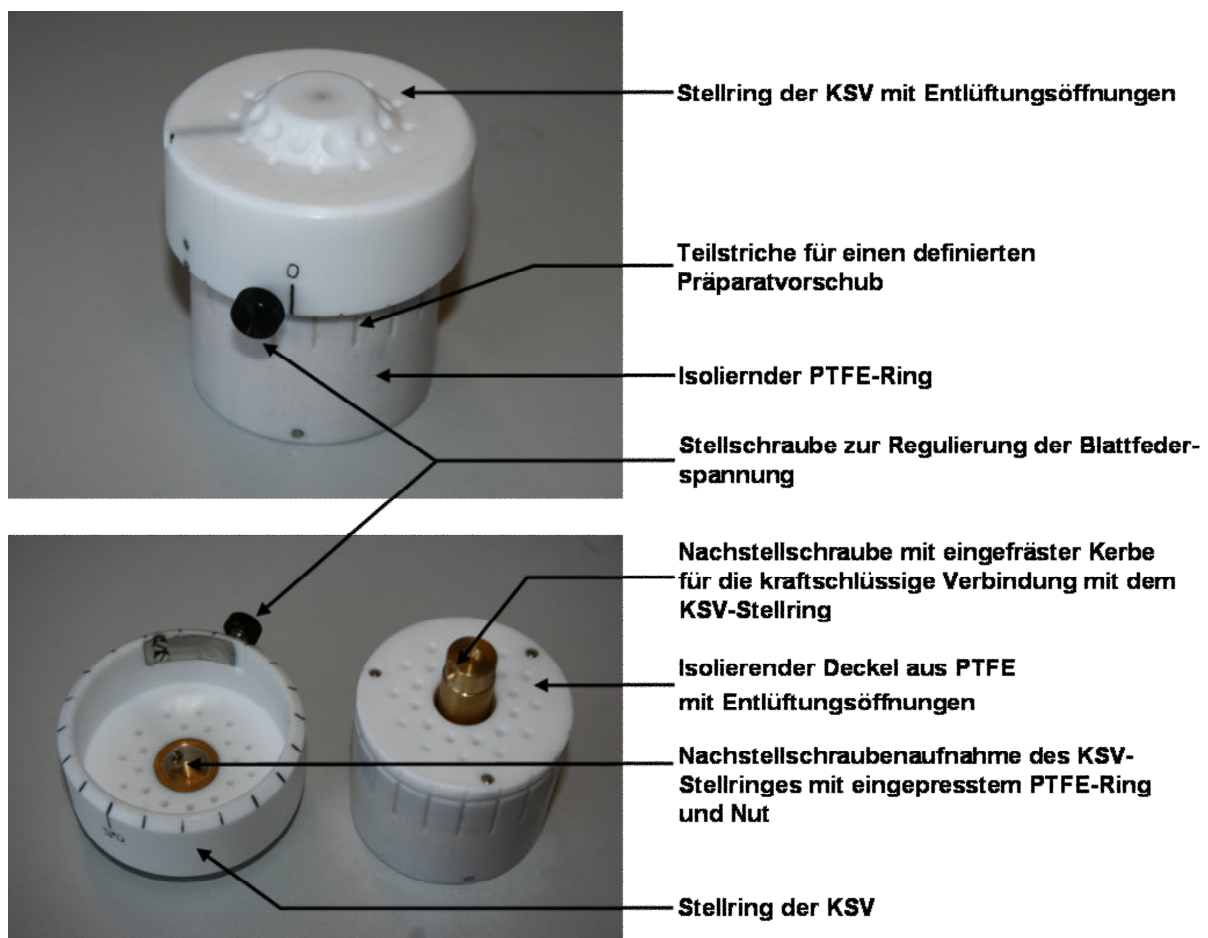


Abbildung 6: Prototyp der weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung vom Typ II (makrofotografische Aufnahme)

Um einen exakten Präparatvorschub in 50 µm-Schritten zu ermöglichen, wurden gemäß der gewählten Gewindesteigung der Nachstellschraube in den oberen Teil der PTFE-Isolierung des Messinggrundkörpers Teilstriche in einer Winkelteilung von 18° eingefräst. Im Inneren des PTFE-Stellringes war entsprechend eine kleine Blattfeder fixiert, deren abgewinkeltes Ende exakt in die eingefrästen Teilstriche greifen konnte. Über eine kleine Schraube auf der Außenseite des PTFE-Stellringes konnte die Spannung der Blattfeder und damit die Festigkeit dieser Verbindung reguliert werden. Somit konnte eine unerwünschte Veränderung des eingestellten Präparatvorschubes durch die Krafteinwirkungen beim Schleifen verhindert werden.

### **3.3.3 Optimierung des Prototyps einer weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung**

Während der Kryoschliffpräparation des humanen Felsenbeinpräparates B mit der KSV vom Typ II zeigte sich, dass der Präparatvorschub z.T. erschwert war. Dies lag vor allem an der durch die Flüssigkeitseinwirkung beim Schleifen unvermeidbaren Eisbildung zwischen den Messingelementen der KSV sowie zwischen Präparat und Fixierungshülse. Wegen der dadurch bestehenden höheren Belastung beim Präparatvorschub wurde die Nut des KSV-Stellringes, welche die Kraft beim Drehen auf die Nachstellschraube überträgt, reponiert.

Um eine bessere Kraftübertragung zwischen KSV-Stellring und Nachstellschraube zu gewährleisten, wurde eine zusätzlich Schraube eingebaut. Diese führte von außen senkrecht durch die Messinghülse des KSV-Stellringes und griff in ein Gewinde, welches in das obere Ende der Nachstellschraube gedreht wurde. Im Folgenden kam es zu keiner Reponierung der Nut des KSV-Stellringes. Um die Eisbildung zwischen Präparat und Fixierungshülse der KSV zu minimieren, wurde in die Fixierungshülse aus Messing ein zusätzlicher PTFE-Ring eingepresst.

Die Abbildung 7 zeigt verschiedene Ansichten des optimierten Prototyps der weiterentwickelten KSV.

Durch die genannten Optimierungen wurde im weiteren Verlauf der Kryoschliffpräparation die Handhabbarkeit der KSV vom Typ II durch einen verbesserten Präparatvorschub deutlich erleichtert.



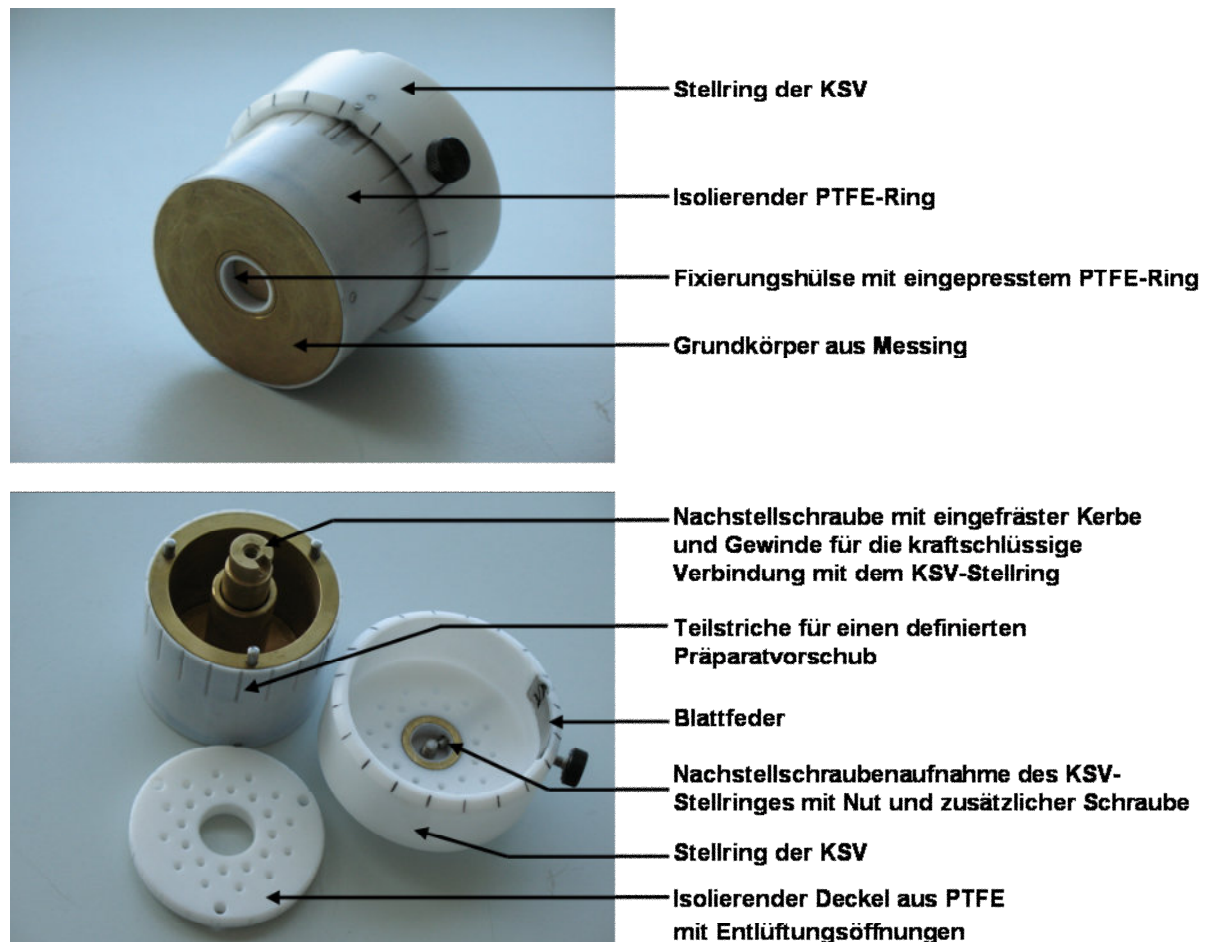


Abbildung 7: Optimierter Prototyp der weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung (makrofotografische Aufnahme)

### 3.4 Kryoschliffpräparation

Zu Beginn der Schliffpräparation wurde ein Präparatvorschub von 150  $\mu\text{m}$  gewählt, damit ein schnelles Auffinden cochleärer Strukturen innerhalb des Kryofelsenbeinpräparates ermöglicht werden konnte. Um möglichst detaillierte Informationen über die cochleäre membranöse Integrität zu gewinnen, wurde im Bereich der Cochlea der Materialabtrag bei beiden Felsenbeinpräparaten auf 50  $\mu\text{m}$  verringert. Der Schleifvorgang wurde jeweils bis zum Erreichen des vollständigen Abtrages des gewählten Präparatüberstandes durchgeführt.

Damit ein exakter Materialabtrag und eine Minimierung mechanischer Schäden gewährleistet werden konnte, war eine Festigung und Fixierung der Proben notwendig. Zur Fixierung der Präparate in der Fixierungshülse erfolgte eine regelmäßige Wasserauffüllung der zylindrischen Probenaufnahme mit nachfolgender Zwischenfrierung. Die intracochleären Hohlräume wurden nach jeder Schliffpräparation ebenfalls mit Wasser aufgefüllt, um eine Stabilisierung der membranösen Strukturen während des Schleifens zu gewährleisten. Damit das Wasser trotz seiner relativ hohen Oberflächenspannung auch in kleinste Hohlräume



eindringen konnte, wurde die Wasserauffüllung wie bei *Herrmann et al.* [27, 28] unter Verwendung eines Wattestäbchens durchgeführt. Der direkte Kontakt des Wattestäbchens mit der Wasseroberfläche führte infolge der Kapillarkräfte an der Grenzfläche zu einem verbesserten Eindringen des Wassers, wodurch eine komplette Wasserauffüllung des Präparates garantiert wurde.

Für die Gefrierschliffpräparation war eine konstante Kühlung des Kryofelsenbeinpräparates sowohl während des Schleifens als auch während der Zwischenlagerung notwendig. Wie in der Arbeit von *Herrmann et al.* [27, 28] wurde auch in der vorliegenden Arbeit der Messingbecher der Kryoschleifvorrichtung (KSV) mit  $\text{CO}_2 \text{ solid}$  (Trockeneis, Sublimationspunkt:  $-78,5^\circ\text{C}$ ) aufgefüllt. Dieses Kühlmittel war einfach zu verarbeiten, gewährleistete einen schnellen Arbeitsablauf und garantierte somit eine konstante Kühlung während der Schliffpräparation. Das  $\text{CO}_2 \text{ solid}$  wurde in einem Dewargefäß gelagert. Die Zwischenlagerung der Felsenbeinpräparate erfolgte während der Versuche in einem mit  $\text{CO}_2 \text{ solid}$ -gefüllten Dewargefäß für mindestens 15 min und über Nacht in einem Gefrierschrank bei  $-21^\circ\text{C}$ .

In der Arbeit von *Herrmann* [111] wurde u.a. das Temperatur-Zeit-Verhalten des Kryofelsenbeinpräparates während der Schliffpräparation ermittelt. Es zeigte sich, dass in einem mittleren Arbeitsfenster von 41 s die Kryoschliffpräparation ein Arbeiten unter  $0^\circ\text{C}$  gewährleistet. Um das für die Präparation von Kryofelsenbeinpräparaten entscheidende Arbeiten im Gefrierbereich zu garantieren, erfolgte in der vorliegenden Studie daher spätestens nach einer Schleifdauer von 41 s eine Kühlmittelauffüllung der KSV.

Für die Kryoschliffpräparation wurde das Schleifgerät EcoMet 3000 (Buehler, Düsseldorf, Deutschland) mit einer rotierenden Schleifscheibe mit einer Drehzahl von 50 U/min verwendet. Das Schleifen erfolgte mit Siliciumcarbid (SiC)-Nassschleifpapieren mit 1200er sowie 2400er Körnung (Buehler, Düsseldorf, Deutschland) unter kontinuierlicher Wasserzufuhr. Der Nassschliff bot den Vorteil der Verhinderung von Reibungswärme und ermöglichte den Abtransport des Probenabriebs durch das Wasser. Um die Eisbildung auf der Auflagefläche der KSV während der Kryoschliffpräparation zu minimieren, wurde jedoch nur mit gedrosselter Wasserzufuhr gearbeitet.

Während des Schleifens wurde keine zusätzliche Druckkraft auf die KSV ausgeübt, so dass der Anpressdruck durch das Eigengewicht der KSV ( $m = 0,4802 \text{ kg}$ ) definiert wurde und demnach  $0,042 \text{ N/mm}^2$  betrug.

### 3.5 „Tissue Printing“

In der vorliegenden Arbeit wurden „Tissue Prints“ (Gewebeabdrücke) von Schliffebenen der Kryofelsenbeinpräparate A und B angefertigt. Die prinzipielle Machbarkeit dieses Verfahrens konnte bereits in den Arbeiten von *Herrmann et al.* [111, 182] gezeigt werden, in denen eine differenzierte Gewebedarstellung cochleärer Strukturen bei nativ belassenen Präparaten erfolgte.

Wegen der soliden Struktur der verwendeten Präparate wurde durch die Druckeinwirkung (2,6 N/mm<sup>2</sup>) beim „Tissue Printing“ ein dreidimensionales Relief der Präparatschliffebene im Printmedium erzeugt. Diese physikalischen Prints wurden in der vorliegenden Arbeit mit einem Stereomikroskop unter Verwendung einer schräg zum Objektisch des Mikroskops einfallenden Lichtquelle untersucht und mittels digitaler Fotografie dokumentiert.

Durch den Molekültransfer von der Oberfläche der Präparatschliffebene auf den Printträger entstanden chemische Prints. Die transferierten Proteine wurden nachfolgend mit immunhistochemischen Methoden auf dem Printträger nachgewiesen.

#### 3.5.1 Auswahl der geeigneten Printmembran

Um als Printträger geeignet zu sein, müssen die verwendeten Membranen bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Sie sollten zum einen eine hohe Bindungskapazität für die zu untersuchenden Makromoleküle aufweisen, dürfen zum anderen aber möglichst keine anderen Zellbestandteile oder histologischen Färbereagenzien unspezifisch binden. Des Weiteren müssen die Membranen gegenüber den verwendeten Chemikalien resistent sein.

Für das Durchführen von „Tissue Prints“ mit tierischen Geweben haben sich Membranen aus Polyamid 6.6 (Nylon) [177, 178, 179], Polyvinylidenfluorid [179] sowie Nitrocellulose [168, 179] etabliert, da sie sowohl Moleküle binden, als auch deren laterales Abdriften auf dem Printträger minimieren. Nach der Durchführung entsprechender Detektierungsverfahren ist somit eine optimale subzelluläre Auflösung gewährleistet.

Nitrocellulosemembranen haben eine besonders hohe Bindungskapazität für Proteine und gelten daher als erste Wahl wenn in einem „Tissue Print“ ein Proteinmolekül detektiert werden soll [176]. Es können sowohl lösliche zytoplasmatische Proteine als auch Proteine, die leicht aus ihrem Zytoskelett- oder Membranverbund herausgelöst werden können, zur Darstellung gebracht werden [164]. Obwohl die genauen Mechanismen zum Teil noch ungeklärt sind, werden hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen als

wahrscheinlichste Ursache für die Interaktion der Proteine mit der Membranmatrix angesehen [164, 176, 183].

Die auf den Printmembranen gebundenen Proteine können mittels immunhistochemischer Methoden zur Darstellung gebracht werden. Um scharfe immunhistochemische Signale sowie eine möglichst hohe subzelluläre Auflösung zu erzielen, sollten die Nitrocellulosemembranen in trockenem Zustand verwendet werden. Die Verwendung feuchter Printmembranen würde beim „Tissue Printing“ zu einer lateralen Diffusion der Makromoleküle innerhalb der Membranmatrix führen und folglich in einem unscharfen immunhistochemischen Signal resultieren [179].

Unabhängig vom Material der verwendeten Membranen spielt bei der Qualität des Bildsignals neben dem Feuchtigkeitsgehalt auch die Porengröße eine Rolle. Je größer die Membranporen, desto geringer ist zwar die zweidimensionale Auflösung, aber desto intensiver ist auch das immunhistochemische Signal. So ist in der Arbeit von *McGrath et al.* [179] die immunhistochemische Anfärbung des Her-2-Rezeptors bei Verwendung einer Membran mit 0,45 µm großen Poren drei- bis sechsmal so intensiv wie bei Verwendung einer Membran mit einer Porengröße von nur 0,05 µm.

Bedingt durch die hohe Bindungskapazität für Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit trockene Optitran™-verstärkte Nitrocellulosemembranen (Optitran BA-S 83, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) verwendet, welche mit einer Porengröße von 0,2 µm bei anschließender immunhistochemischer Färbung ein Signal in guter zweidimensionaler Auflösung und Intensität zur Darstellung brachten. Optitran™-Membranen bestehen aus 100 % reiner Nitrocellulose, die auf beide Seiten eines inerten Polyester-Trägermaterials aufgegossen ist. Das Trägermaterial verleiht der Membran Flexibilität und Festigkeit, ohne die Transferbedingungen oder Ergebnisse zu beeinflussen. Die Proteinbindungskapazität dieser Printmembran beträgt 75-90 µg/cm<sup>2</sup>.

Nach Durchführung des „Tissue Printings“ wurden die Printmembranen in einem Exsikkator bei Raumtemperatur schonend gelagert. Damit standen sie für die spätere immunhistochemischen Färbung in bestmöglichem Zustand und unter weitestgehender Erhaltung des physikalischen Prints zur Verfügung.

### 3.5.2 Versuchsdurchführung „Tissue Printing“

Gewebeabdrücke wurden von Schliffebenen der Kryofelsenbeinpräparate hergestellt, in denen cochleäre Strukturen zur Darstellung kamen. Zum Erreichen der Schliffebene wurde der durch einen definierten Vorschub gewählte Präparatüberstand (im Bereich der Cochlea

50 µm) vollständig abgetragen. Das Präparat wurde nachfolgend ca. 1 mm über das Niveau der Schleifvorrichtung vorgeschoben, bis ein makroskopisch sichtbarer Überstand erzielt wurde. Somit konnte gewährleistet werden, dass beim anschließenden „Tissue Printing“ alleinig das Präparat und nicht die KSV ein Relief im Printträger hinterläßt.

*Okabe et al.* [164] haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass beim „Tissue Printing“ von gefrorenen murinen Gewebeschnitten das Ausmaß des Proteinüberganges unabhängig von der gewählten Schnittdicke ist. Ursächlich hierfür ist, dass beim „Tissue Printing“ nur die Zelllage der angeschnittenen Fläche für einen Proteinübergang auf die Printmembran zugänglich ist. Dies gilt auch für die hier beschriebene Kryoschliffpräparation: Bereits durch ein kurzes Anschleifen der Präparatebene wird eine weitere Zelllage eröffnet, die für einen erneuten Proteintransfer zur Verfügung steht. Von der gewählten Präparatebene können somit beliebig viele Prints hergestellt werden.

Für die Durchführung des „Tissue Printings“ wurde die Optitran™-verstärkte Nitrocellulosemembran auf ein Filterpapier (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) aufgebracht, so dass eine beschleunigte Diffusion der oberflächlich gelösten cochleären Proteine erzielt werden konnte. Als Unterlage für das Filterpapier diente eine Arbeitsplatte, welche als Widerlager für den gewählten Anpressdruck von 2,6 N/mm<sup>2</sup> diente. Mit diesem, in einem Vorversuch ermittelten, Anpressdruck wurden makroskopische Reliefs in der Nitrocellulosemembran erzeugt, welche den physikalischen Prints entsprachen. Der Anpressdruck wurde während der gesamten Versuchsreihen konstant gehalten, um eine Vergleichbarkeit der gewonnen Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Anpresszeit war hingegen ein variabler Parameter. *Okabe et al.* [164] zufolge nimmt die Menge an Proteinen, welche auf der Printmembran gebunden werden können, mit größer werdender Anpresszeit zu. Bei Anpresszeiten größer 10 min ist schließlich ein Plateau erreicht. In der genannten Studie wurden gefrorene Gewebeschnitte verwendet, welche während des Anpressens auf der Printmembran auftauten. Im Gegensatz dazu sollten in der vorliegenden Arbeit die Präparate während des Printvorgangs durch die kontinuierliche Kühlung mittels CO<sub>2</sub> solid kryofixiert bleiben. Die maximale Anpresszeit war daher durch die Bedingung limitiert, dass ein schonendes Trennen des Printträgers von dem Kryofelsenbeinpräparat ermöglicht werden musste. In der Studie von *Herrmann* [111] traten bei Anpresszeiten ≥ 10 Sekunden bereits Schäden der Nitrocellulosemembran auf, so dass für die Vorversuche mit dem Felsenbeinpräparat A initial eine Anpresszeit von 5 Sekunden gewählt wurde. In Tabelle 9 ist der Ablauf dieser Vorversuche beschrieben.

Tabelle 9: Durchführung des „Tissue Printings“ in den Vorversuchen  
(Felsenbeinpräparat A: „Tissue Prints“ Nr. 1 bis 13)

Präparationsablauf	Prozessparameter
Auffüllen der KSV mit CO <sub>2</sub> solid	
Kryoschliffpräparation zum Freilegen einer neuen Zelllage	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li> <li>- SiC-Schleifpapier mit 1200er Körnung</li> <li>- Kontinuierliche Kühlung mittels CO<sub>2</sub> solid</li> </ul>
Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation der Präparatschliffebene	
„Tissue Printing“	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Optitran™-verstärkte Nitrocellulosemembran (Unterlage: Filterpapier)</li> <li>- Anpressdruck: 2,6 N/mm<sup>2</sup></li> <li>- Anpresszeit: 5 Sekunden</li> </ul>
Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation des „Tissue Prints“	
Wasserauffüllung des Felsenbeinpräparates	
Zwischenkühlung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In einem CO<sub>2</sub> solid-gefüllten Dewargefäß für mindestens 15 min</li> </ul>

### 3.5.3 Verfahren zur Maximierung der Anpresszeit beim „Tissue Printing“

Um einen größtmöglichen Proteinübergang auf die Nitrocellulosemembran zu erzielen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Anpresszeit maximiert werden. Dies wurde durch die Optimierung der Bedingungen für das Trennen der Printmembran vom Kryofelsenbeinpräparat realisiert. In unterschiedlichen Versuchsreihen wurde deshalb das Präparat vor der Durchführung des Gewebedruckes oberflächlich mit 70%igem Ethanol gespült oder mit Glycerol verschiedener Konzentrationen benetzt. Die entsprechenden Versuchsabläufe werden nachfolgend beschrieben.

#### 3.5.3.1 „Tissue Printing“ mit vorheriger Ethanolspülung

In der ersten Versuchsreihe zur Verlängerung der Anpresszeit wurden die Schliffebenen des Felsenbeinpräparates A direkt vor der Durchführung des „Tissue Printings“ für 2 Sekunden mit 70%igem Ethanol gespült. Da Ethanol den Gefrierpunkt von Wasser senkt, sollte somit ein Anfrieren der Printmembran am Präparat verhindert werden. Im Rahmen dieser Versuchsreihe, deren Durchführung in Tabelle 10 aufgeführt ist, wurden sieben „Tissue Prints“ angefertigt.

Tabelle 10: Durchführung des „Tissue Printings“ mit vorheriger Ethanolspülung (Felsenbeinpräparat A: „Tissue Prints“ Nr. 14 bis 20)

Präparationsablauf	Prozessparameter
Auffüllen der KSV mit CO <sub>2</sub> solid	
Kryoschliffpräparation zum Freilegen einer neuen Zellschicht	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li> <li>- SiC-Schleifpapier mit 1200er Körnung</li> <li>- Kontinuierliche Kühlung mittels CO<sub>2</sub> solid</li> </ul>
Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation der Präparatschliffebene	
Präparatschliffebene mit 70%igem Ethanol für 2 s spülen	
Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation der Präparatschliffebene	
Überschuss an 70%igem Ethanol von der Auflagefläche der KSV mittels Präzisionstuch (Kimwipe, Kimberly-Clark, Deutschland) entfernen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nur bei „Tissue Prints“ Nr. 18 bis 20 durchgeführt</li> </ul>
„Tissue Printing“	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Optitran™-verstärkte Nitrocellulosemembran (Unterlage: Filterpapier)</li> <li>- Anpressdruck: 2,6 N/mm<sup>2</sup></li> <li>- Anpresszeit variabel: 5 und 10 s</li> </ul>
Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation des „Tissue Prints“	
Wasserauffüllung des Felsenbeinpräparates	
Zwischenkühlung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In einem CO<sub>2</sub> solid-gefüllten Dewargefäß für mindestens 15 min</li> </ul>

### 3.5.3.2 „Tissue Printing“ mit vorheriger Glycerolbenetzung

Durch die Anwesenheit des dreiwertigen Alkohols Glycerol (1,2,3-Propantriol) wird der Gefrierpunkt einer Lösung deutlich herabgesetzt [184]. Als Stammlösung wurde Glycerol anhydrous (Fluka BioChemica, Buchs, Schweiz) verwendet, welches mit Aqua dest. verdünnt wurde, um die gewünschte Zielkonzentration zu erhalten. Es wurden 30%ige sowie 40%ige Glycerollösungen hergestellt. Ein Vorteil des Glycerols gegenüber dem Ethanol ist seine höhere Viskosität. Somit sollte bei Benetzung der Präparatschliffebene das laterale Abdriften der Proteine minimiert werden. Um dies zu realisieren, musste die Glycerollösung in einem textilen Träger fixiert werden, welcher aus einem Zellstofftupfer (Pur-Zellin®, Hartmann, Heidenheim, Deutschland) und einem Filterpapier (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) bestand. Dieser textile Träger wurde in einem flachen Becherglas platziert und mit 10 ml der Glycerolziellösung durchtränkt. Der entsprechende Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 dargestellt.

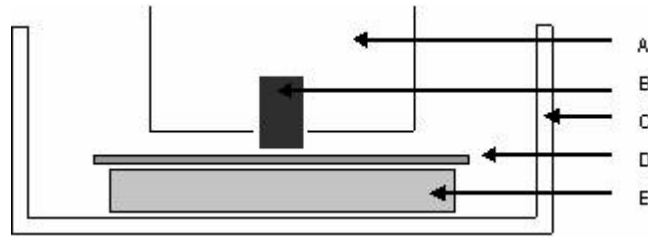


Abbildung 8: Versuchsaufbau Glycerolbenetzung der Präparatschliffebene

(A = Kryoschleifvorrichtung, schematisch; B = Kryofelsenbeinpräparat;  
C = Becherglas; D = Filterpapier; E = Zellstofftupfer)

Durch die zweisekündige Glycerolbenetzung der Schliffebenen der Felsenbeinpräparate A und B direkt vor der Durchführung des „Tissue Printings“ sollte die Anpresszeit maximiert werden. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurden 53 „Tissue Prints“ angefertigt, deren Durchführung in Tabelle 11 aufgeführt ist.

Tabelle 11: Verfahrensoptimierung „Tissue Printing“ mit vorheriger Glycerolbenetzung, Präparationsablauf  
(Felsenbeinpräparat A: „Tissue Prints“ Nr. 21 bis 27, Felsenbeinpräparat B: „Tissue Prints“ Nr. 28 bis 73)

„Tissue Print“ Nr. 21 - 43	„Tissue Print“ Nr. 44 - 52	„Tissue Print“ Nr. 53 - 73
Auffüllen der KSV mit CO <sub>2</sub> solid	Ø	Ø
Kryoschliffpräparation zum Freilegen einer neuen Zelllage: <ul style="list-style-type: none"><li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li><li>- SiC-Schleifpapier mit 1200er Körnung</li><li>- Schleifdauer max. 41 s</li></ul>	Kryoschliffpräparation zum Freilegen einer neuen Zelllage: <ul style="list-style-type: none"><li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li><li>- SiC-Schleifpapier mit 1200er Körnung</li><li>- Schleifdauer max. 10 s</li></ul>	Kryoschliffpräparation zum Freilegen einer neuen Zelllage: <ul style="list-style-type: none"><li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li><li>- SiC-Schleifpapier mit 2400er Körnung</li><li>- Schleifdauer max. 10 s</li></ul>
Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation der Präparatschliffebene		
Ø	Auffüllen der KSV mit CO <sub>2</sub> solid	Auffüllen der KSV mit CO <sub>2</sub> solid
Ø	Ø	Kryoschliffpräparation zum Entfernen oberflächlicher Eiskristalle: <ul style="list-style-type: none"><li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li><li>- SiC-Schleifpapier mit 2400er Körnung</li><li>- Schleifdauer 1 s</li></ul>
	Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation der Präparatschliffebene	
Präparatschliffebene mit Glycerolziellösung für 2 s benetzen		
„Tissue Printing“: <ul style="list-style-type: none"><li>- Optitran™-verstärkte Nitrocellulosemembran (Unterlage: Filterpapier)</li><li>- Anpressdruck: 2,6 N/mm<sup>2</sup></li><li>- Anpresszeit variabel (10, 15, 20, 25, 30 s)</li></ul>	„Tissue Printing“: <ul style="list-style-type: none"><li>- Optitran™-verstärkte Nitrocellulosemembran (Unterlage: Filterpapier)</li><li>- Anpressdruck: 2,6 N/mm<sup>2</sup></li><li>- Anpresszeit variabel (20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 s)</li></ul>	
Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation des „Tissue Prints“		
Wasserauffüllung des Felsenbeinpräparates		
Zwischenkühlung in einem CO <sub>2</sub> solid-gefüllten Dewargefäß für mindestens 15 min		



### 3.6 Immunhistochemische Färbung

Während des in der vorliegenden Arbeit angewandten „Tissue Printings“ fand ein Proteintransfer von der Gefrierschliffebene des Felsenbeinpräparates auf den Printträger statt. Um das Ausmaß dieses Proteinüberganges orientierend beurteilen zu können, wurden in Vorversuchen mit ausgewählten „Tissue Prints“ des Felsenbeinpräparates B zwei Proteinfarbstoffe auf ihre Eignung hin überprüft. Damit eine optimale Darstellung mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM FluoView FV1000, Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) gewährleistet werden konnte, wurden ausschließlich fluoreszierende Farbstoffe verwendet:

- RuBPS (Ruthenium (II) tris Bathophenanthrolindisulfonat, Dye Hard, Armin Baack, Schwerin, Deutschland)  
→ zur Färbung der „Tissue Prints“ 30, 32, 34, 35, 63 und 64,
- DyLight™ 488 NHS Ester (Thermo Scientific, USA)  
→ zur Färbung der „Tissue Prints“ 36, 37, 40 und 42.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab jedoch, dass mit keinem dieser Färbeverfahren ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal detektierbar war. Die Ursache hierfür lag in der direkten Bindung der Farbstoffe an die Proteine. Ähnlich der Methode der direkten Immunfluoreszenz ist durch die fehlende Möglichkeit der Verstärkung des Fluoreszenzsignals die Sensitivität daher eingeschränkt.

Deutlich sensitiver und demzufolge in den Hauptversuchen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kommend, ist die Methode der indirekten Immunfluoreszenz. Mit Hilfe dieses speziellen Verfahrens der Immunhistochemie wurden in ausgewählten „Tissue Prints“ von Gefrierschliffen humaner Felsenbeinpräparate die Proteine Kollagen Typ IV sowie Connexin 26 nachgewiesen.

Zuerst wurden die Zielantigene mit einem unkonjugiertem spezifischen Primärantikörper markiert. In einem zweiten Schritt wurde ein gegen diesen Antikörper gerichteter Sekundärantikörper eingesetzt, der mit einem Fluorchrom konjugiert war. Durch die Bindung mehrerer Sekundär-AK-Moleküle an ein Molekül des Primär-AK wurde die Amplifikation des Fluoreszenzsignals ermöglicht. Zudem wurde die Bindung des Primär-AK durch die lange Inkubationszeit (12 h) bei 4°C und leichter Bewegung auf einer Schüttelplatte optimiert. Die optimierte Antikörperbindung resultierte in einer Verbesserung der AG-AK-Reaktion und somit ebenfalls in einer Steigerung des Fluoreszenzsignals [185].

Um eine möglichst spezifische immunhistochemische Reaktion zu gewährleisten, wurden in der vorliegenden Arbeit nur affinitätschromatisch aufgereinigte Antikörperlösungen verwendet [152]. Damit die Wirkung von evtl. noch vorhandenen Verunreinigungen vermindert wurde, sind die Antikörperlösungen nur verdünnt verwendet worden. Durch die Verdünnung konnte der Einfluss niedrigaffiner, kreuzreagierender Antikörper minimiert werden [186]. Dank der Verwendung des monoklonalen Primärantikörpers zum Nachweis von Kollagen Typ IV (mouse anti-collagen Type IV COL4A, Santa Cruz Biotechnology, USA) wurde das Auftreten von unerwünschten Kreuzreaktionen zusätzlich reduziert.

Neben der präzisen Darstellung der gesuchten antigenen Proteine sollten nichtspezifische Hintergrundfärbungen bzw. -fluoreszenzen gering ausgeprägt sein. Als unspezifische Hintergrundfärbung sind alle positiven Färbungen anzusehen, die nicht als Ergebnis der AG-AK-Bindung zustande gekommen sind. Um solche falsch positiven Ergebnisse möglichst zu vermindern, wurden bei der Durchführung der Versuche folgende Aspekte beachtet:

- Die verwendeten Primär-AK wurden nur verdünnt verwendet.
- Vor der Inkubation mit dem AK wurden unspezifische reaktive Bindungsstellen mittels einer gebrauchsfertigen Blockierungslösung (Antibody Diluent, BD Biosciences Germany, Heidelberg), welche bovines Serumalbumin und Ziegen-Serum beinhaltet, geblockt.
- Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Printmembranen ausreichend lange mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS, Sigma-Aldrich, USA) gewaschen.
- Da eine Denaturierung von Proteinen zur Veränderung der Antigenstruktur mit folglich abweichender AG-AK-Reaktion führt, wurde durch das native Belassen der Felsenbeinpräparate das Auftreten unspezifischer Bindungen ebenfalls reduziert.

Eine immunhistochemische Reaktion gilt als spezifisch, wenn die resultierende Farbreaktion bzw. Fluoreszenz auf die Antigenlokalisation beschränkt und durch den verwendeten Antikörper verursacht ist. Durch Weglassen eines unverzichtbaren Reaktionsschrittes kann unter Beibehaltung der sonstigen experimentellen Bedingungen der immunhistochemische Nachweis auf seine Spezifität hin geprüft werden (negative Kontrollreaktion) [187].

In der vorliegenden Arbeit wurde in jeder Versuchsreihe eine solche Negativkontrolle, in welcher der reguläre Primär-AK durch Blockierungslösung ersetzt wurde, mitgeführt. Nach anschließender Inkubation mit dem Fluorchrom-konjugierten Sekundär-AK bestand die Möglichkeit, unspezifische Fluoreszenzsignale zu detektieren.

### 3.6.1 Versuchsdurchführung Immunfluoreszenzfärbung

Um eine größtmögliche Schonung der „Tissue Prints“ zu gewährleisten, wurden diese erst kurz vor Beginn der Versuchsdurchführung aus dem Exsikkator, in welchem sie gelagert worden sind, entnommen. Anschließend wurden die Printmembranen zurechtgeschnitten und einzeln in die Kammern ( $\varnothing$  21 mm) einer 12er-Wellplatte (BD Biosciences Germany, Heidelberg, Deutschland) überführt. Während der immunhistochemischen Färbung wurden die Printmembranen in den jeweiligen Wellkammern belassen. Um die einzelnen Waschgänge und Inkubationen zu optimieren, wurde die 12er-Wellplatte auf einer Schüttelplatte fixiert.

#### 3.6.1.1 Nachweis von Kollagen Typ IV

Die immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ IV erfolgte bei ausgewählten „Tissue Prints“ (Nr. 38, 43, 45, 52, 55, 60, 66, 68, 69, 70, 72 und 73) des Felsenbeinpräparates B. „Tissue Print“ Nr. 50 wurde zusätzlich als Negativkontrolle mitgeführt.

Nach dreimaligem Waschen der „Tissue Prints“ mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Lösung, Sigma-Aldrich, USA) erfolgte bei Raumtemperatur die einstündige Inkubation mit der Blockierungslösung. Anschließend wurde der Primär-AK (mouse anti-collagen Type IV COL4A, Santa Cruz Biotechnology, USA) zu der in der Blockierungslösung liegenden Printmembran hinzugegeben. Nachdem der Primär-AK über 12 h bei 4°C inkubierte, wurde die Printmembran erneut mit PBS-Lösung gewaschen und für 30 min mit Blockierungslösung versetzt. Nach Zugabe des lichtempfindlichen Sekundär-AK (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Invitrogen Germany, Darmstadt) erfolgte eine letzte Inkubation über 60 min unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur mit abschließendem dreimaligen Waschen mit PBS-Lösung.

Die Färbeprozedur und die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 6 und Tabelle 7 des Kapitels 3.1.2 aufgeführt.

Nach der letzten Waschprozedur wurden die vorbereiteten Printmembranen einzeln zur qualitativen Auswertung mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM FluoView FV1000, Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) auf gereinigte Objektträger gebracht. Um ein Austrocknen der Membranen zu verhindern, wurde ein Tropfen PBS-Lösung auf die Membranen gegeben, welche anschließend mit einem Deckgläschen bedeckt wurden. Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 519 nm konnte das Kollagen Typ IV unter dem CLSM dargestellt werden.

### 3.6.1.2 Nachweis von Connexin 26

Bei ausgewählten „Tissue Prints“ (Nr. 66, 68, 69 und 70) des Felsenbeinpräparates B erfolgte der immunhistochemische Nachweis von Connexin 26. „Tissue Print“ Nr. 71 wurde zusätzlich als Negativkontrolle mitgeführt.

Der Ablauf der Färbeprozedur, welcher dem beim Nachweis von Kollagen Typ IV beschriebenen Prozedere ähnelt, ist in Tabelle 12 und die verwendeten Chemikalien und Lösungen sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 12: Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter „Tissue Prints“ zum Nachweis von Connexin 26

	Arbeitsschritt	Chemikalien/ Lösungen	Menge pro Well- kammer	Zeit	Reaktionsbedingungen
1	Waschprozedur	PBS-Lösung	1000 µl	3 x 5 min	RT, Schüttelplatte
2	PBS-Lösung aus Well entfernen				
3	Inkubation	Blockierungslösung	960 µl	1 h	RT, Schüttelplatte
4	Inkubation	Primärer AK	40 µl	12 h	4°C (Kühlschrank), Schüttelplatte
5	Blockierungslösung + Primären Ak zur Wiederverwertung aus Well entfernen, in einen Falcon überführen und bei 4°C im Kühlschrank lagern				
6	Waschprozedur	PBS-Lösung	1000 µl	3 x 5 min	RT, Schüttelplatte
7	PBS-Lösung aus Well entfernen				
8	Inkubation	Blockierungslösung	995 µl	30 min	RT, Schüttelplatte
7	Inkubation	Sekundärer AK	5 µl	1 h	RT, Schüttelplatte, unter Lichtausschluss
8	Blockierungslösung + Sekundären AK zur Wiederverwertung aus Well entfernen, in einen vor Licht geschützten Falcon überführen und bei 4°C im Kühlschrank lagern				
9	Waschprozedur	PBS-Lösung	1000 µl	3 x 5 min	RT, Schüttelplatte, unter Lichtausschluss

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien und Lösungen bei der Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter „Tissue Prints“ zum Nachweis von Connexin 26

Chemikalien/ Lösungen	Verwendetes Produkt	Erläuterung/ Funktion
Blockierungslösung	Antibody Diluent (BD Biosciences Germany, Heidelberg)  [gebrauchsfertiger Natriumphosphatpuffer, der bovines Serumalbumin und Ziegen-Serum beinhaltet]	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Blockierung der unspezifischen Bindungen des primären AK und Verdünnung der Stammlösung des primären AK in einem Verhältnis 1:25</li> <li>– Blockierung der unspezifischen Bindungen des sekundären AK und Verdünnung der Stammlösung des sekundären AK in einem Verhältnis 1:200</li> </ul>
Primärer AK	rabbit anti-Connexin 26 (Invitrogen Germany, Darmstadt)  [Konzentration der Stammlösung: 0,25 mg/ml]	<ul style="list-style-type: none"> <li>– polyklonaler AK gegen humanes und murines Connexin 26</li> </ul>
Sekundärer AK	Alexa Fluor 405 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen Germany, Darmstadt)  [Konzentration der Stammlösung: 2 mg/ml]	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Fluorchrom-konjugierter AK gegen rabbit IgG</li> </ul>
PBS-Lösung	phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich, USA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Entfernung nicht bindender AK im Anschluss an die Inkubation</li> </ul>

Analog dem Nachweis von Kollagen Typ IV wurden nach der letzten Waschprozedur die Printmembranen einzeln auf gereinigte Objektträger gebracht, zur Vermeidung von Austrocknung mit 1 Tropfen PBS-Lösung benetzt und von einem Deckgläschen geschützt. Bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 422 nm konnte das Connexin 26 unter dem CLSM dargestellt werden.

### 3.7 Dokumentation

Zur Dokumentation der Versuchsdurchführungen und der Ergebnisse wurden die Methoden Stereomikroskopie, konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (Fluoreszenzdetektion und Oberflächendarstellung) sowie Mikro-Computertomographie zur morphologischen und histologischen Darstellung der membranösen cochleären Strukturen eingesetzt. Die digitalen Bilddaten wurden elektronisch gespeichert.

### 3.7.1 Stereomikroskopie

Die stereomikroskopischen Aufnahmen dienten in der vorliegenden Studie der Dokumentation der verschiedenen Schliffebenen der Kryofelsenbeinpräparate und der jeweiligen physikalischen „Tissue Prints“.

Stereomikroskope sind spezielle Lichtmikroskope, die der dreidimensionalen Darstellung makro- und mikroskopischer Objekte dienen [188]. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Stereomikroskop Stemi 2000-C (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) ist nach dem Prinzip des Greenough-Types konstruiert. Es besteht demnach aus zwei identischen, in einer gemeinsamen Fassung befindlichen Tuben mit je einem Objektiv und Okular, deren optische Achsen um den Stereowinkel von  $11^\circ$  gegeneinander geneigt sind. Durch den Einbau von Porro-Prismen werden aufrechtstehende und seitenrichtige Abbildungen erzeugt.

Das Stemi 2000-C ist mit einem stufenlosen Vergrößerungswechsler (Zoom) 7,7 : 1 sowie einem zusätzlichen Tubus zum Anschluss einer Kamera ausgerüstet.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bilddokumentation mit der Digitalkamera Canon Powershot A620 (Canon Deutschland, Krefeld), welche über einen Adaptertubus (Soligor, Leinfelden-Echterdingen, Deutschland) an das Stereomikroskop angeschlossen wurde.

Zur optimalen Ausleuchtung der Gefrierschliffebenen des Felsenbeinpräparates und der jeweiligen „Tissue Prints“ diente die faseroptische Kaltlichtquelle CL1500 ECO (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit einer Halogenreflektorlampe und zwei flexiblen Lichtleitern.

### 3.7.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Zur mikroskopischen Fluoreszenzdetektion und Oberflächendarstellung kam in der vorliegenden Arbeit die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie zum Einsatz.

Konfokale Mikroskope stellen eine besondere Klasse der Lichtmikroskope dar. Beim konventionellen Lichtmikroskop wird die eigentliche Information aus der fokalen Ebene von unscharfen Informationen aus Ebenen unterhalb und oberhalb der Fokusebene überlagert. Das Ziel der konfokalen Mikroskopie ist es, dreidimensionale Objekte in einen Stapel optischer, konfokaler Schnittebenen zu zerlegen, damit nur die Information im Fokus zur Bildformierung verwendet wird. Konfokale Mikroskope arbeiten nach dem Auflichtprinzip, wodurch die Untersuchung lichtundurchlässiger Proben ermöglicht wird [189].

Bei konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen (CLSM) dient ein Laserstrahl als Lichtquelle. Die korrekte Wellenlänge für die Beleuchtung eines Fluoreszenzfarbstoffes kann durch einen Eingangssperrfilter ausgewählt werden. Der Laserstrahl trifft dann auf einen dichromatischen Teilerspiegel, der das Anregungslicht zum Objektiv lenkt. Dieser Teilerspiegel reflektiert das Anregungslicht von kleiner Wellenlänge und ist gleichzeitig durchlässig für das langwelligere

Licht der Emissionsstrahlung. Über das Objektiv wird das Anregungslicht des Laserstrahls in die Probe fokussiert und regt dort Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission an. Die Emissionsstrahlung passiert den Strahlengang nun in umgekehrter Richtung. Sie wird über das Objektiv gesammelt und durch den dichromatischen Teilerspiegel zum Detektor weitergeleitet, der das eintreffende Licht in elektrische Signale umwandelt (Photomultiplier). Über einen zwischengeschalteten Emissionsfilter (Ausgangssperrfilter) wird der interessierende Wellenlängenbereich des Fluoreszenzspektrums selektiert. Vor dem Detektor und in einer zum Fokus des Objektivs konfokalen Ebene befindet sich eine Lochblende (konfokale Blende). Das heißt, dass Objektiv und Lochblende einen gemeinsamen Brennpunkt besitzen. Die konfokale Blende lässt demnach nur Licht passieren, welches Informationen aus der Fokusebene trägt. Licht mit unscharfer Information aus Ebenen über- oder unterhalb der Fokusebene wird ausgeblendet und trägt dadurch nicht zur Bildentstehung bei. Der schematische Strahlengang konfokaler Laser-Scanning-Mikroskope ist in Abbildung 9 dargestellt [190, 191].

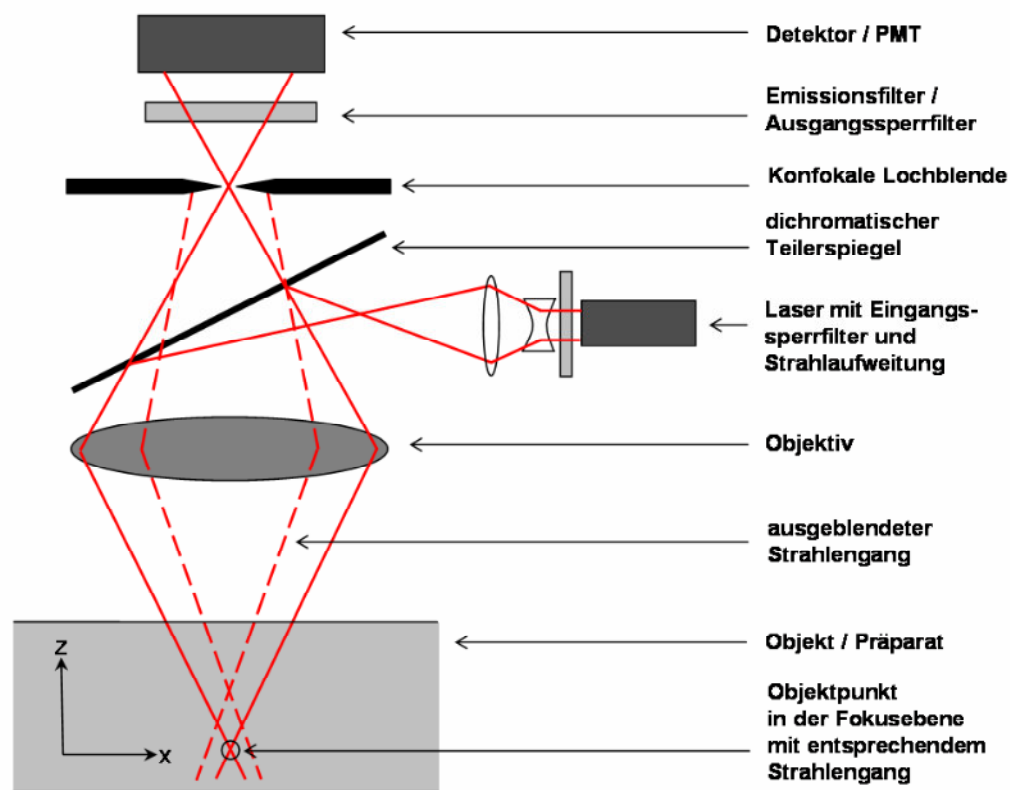


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Strahlenganges durch ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop

Im Unterschied zum konventionellen Lichtmikroskop, bei dem die Transformation vom Objekt zum Bild für alle Objektpunkte gleichzeitig erfolgt, entsteht beim konfokalen Mikroskop zunächst nur ein einziger Bildpunkt. Um ein vollständiges Bild des Präparates zu erhalten, muss dieses Punkt für Punkt durch eine gezielte Ablenkung des Anregungslaserstrahles gerastert (gescannt) werden. Viele Punkte in x-Richtung ergeben eine Zeile, viele Zeilen in y-Richtung ergeben ein konfokales Bild einer optischen Schnittebene des Präparates. Nun wird das Präparat in z-Richtung um einen bestimmten Betrag bewegt und ein nächstes konfokales Bild aufgenommen. Durch die Aufnahme mehrerer solcher konfokaler Bilder wird ein Stapel optischer Schnitte generiert. Abschließend erfolgt die Digitalisierung der Objektinformationen und die Ausgabe der Bilddaten in Pixel (x-, y-Richtung) bzw. Voxel (x-, y-, z-Richtung) aus dem digitalen Bildspeicher.

Die Untersuchung der „Tissue Prints“ erfolgte in der vorliegenden Studie mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop CLSM-FluoView FV1000 (Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland), welches mit einem Multiline-Argonlaser (Wellenlängen: 457 nm, 488 nm und 515 nm) sowie einer Laserdiode (Wellenlänge: 405 nm) als selektierbare Laserquellen ausgestattet war. Neben der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der immunhistochemisch gefärbten „Tissue Prints“ konnte mit Hilfe des differentiellen Interferenzkontrastes (DIC) außerdem das Relief des physikalischen Prints in mikroskopischer Auflösung dargestellt werden.

Beim Arbeiten mit dem DIC wird durch die Einbringung eines doppelbrechenden Prismas in den Anregungsstrahlengang des CLSM, dieser in zwei Teilstrahlen aufgespalten, welche seitlich gegeneinander versetzt auf die Probe eintreffen. Befindet sich auf der Probenoberfläche zwischen beiden Teilstrahlen ein Höhenunterschied, erhält einer der beiden Teilstrahlen einen Gangunterschied. Dieser wird anschließend in Grauwerte umgesetzt und ist somit für den Betrachter als Relief sichtbar.

### 3.7.3 Mikro-Computertomographie

Die Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) diente in der vorliegenden Arbeit sowohl der zwei- als auch dreidimensionalen Darstellung der verwendeten Felsenbeinpräparate. Das Verfahren der Mikro-CT ermöglicht die nicht-invasive Darstellung der inneren Struktur einer lichtundurchlässigen Probe in nahezu histologischer Qualität [141]. Die erzeugten Schnittbilder wurden zum einen für die Orientierung während der anschließenden Gefrierschliffpräparation verwendet und zum anderen vergleichend den licht- sowie fluoreszenzmikroskopischen Bildern gegenübergestellt.



Das Prinzip des bildgebenden Verfahrens der Computertomographie basiert auf der Durchstrahlung eines Objektes mit Röntgenstrahlen aus verschiedenen Richtungen. Diese Strahlen werden von Detektoren aufgezeichnet. Die Strahlungsintensität zwischen ausgesandter und gemessener Strahlung wird verglichen und gibt so Aufschluss über die Abschwächung (Attenuation) durch das untersuchte Gewebe. Dieser Schwächungskoeffizient wird in verschiedenen Grauwerten dargestellt und auf der Hounsfield-Skala angegeben. Die gewonnenen Daten werden über ein mathematisches Verfahren (Algorithmus) zu einem Volumendatensatz zusammengefügt, anhand dessen man Schnittbilder und dreidimensionale Ansichten des untersuchten Objektes in beliebigen Ebenen rekonstruieren kann.

Das Ziel in der Entwicklung der Mikro-CT lag darin, die Mikrostruktur von untersuchten Objekten detailliert darzustellen, wofür eine hohe Auflösung notwendig ist. Bei modernen klinischen Ganzkörper-CT-Geräten liegt die Ortsauflösung bei über 1 mm. Mit der Mikro-CT ist es hingegen möglich, Ortsauflösungen zwischen 5 und 50  $\mu\text{m}$  zu erzielen [192]. Damit eine so hohe Auflösung erreicht werden kann, sind Strahlungsquellen mit sehr geringen Fokusgrößen notwendig. Bei Mikro-CT-Scannern kommen deshalb spezielle Fein- und Mikrofokusröntgenröhren oder hochenergetische Synchrotronstrahlungsquellen zum Einsatz. Strahlungsquelle und Detektor sind hierbei ortsfest installiert und durchstrahlen das rotierende Objekt. Der Abstand zwischen Quelle und Objekt sowie Objekt und Detektor kann dabei verändert werden, wodurch Vergrößerungseinstellungen möglich sind.

Der Zusammenhang zwischen Probengröße und Auflösung ist laut *Engelke et al.* [192] ca. über einen Faktor 1000 definiert. Bei einer gewünschten Auflösung von 20 – 30  $\mu\text{m}$  ist die maximale Probengröße somit auf 2 – 3 cm begrenzt. Die Messzeiten liegen bei Mikro-CT-Untersuchungen je nach Auflösung im Minuten- bis Stundenbereich.

In der vorliegenden Arbeit kam ein hochauflösender Mikro-Computertomograph (SkyScan 1172 HR micro-CT, Aartselaar, Belgien) zum Einsatz. Die Messung wurde mit einer Beschleunigungsspannung von  $U = 80 \text{ kV}$  und einer Stromstärke von  $I = 100 \mu\text{A}$  durchgeführt. Das aufgetaute Felsenbeinpräparat wurde auf dem zentral liegenden Objektisch fixiert und ausgerichtet. Während der Messung wurde die Probe einmal um  $360^\circ$  um ihre Vertikalachse schrittweise um  $0,7^\circ$  gedreht. In jeder neuen Winkeleinstellung wurden zweidimensionale Projektionen des Präparates aufgenommen und über den Detektor verarbeitet. Nach der vollständigen Drehung der Probe um ihre eigene Achse sowie der Rekonstruktion des Datensatzes wurde ein Tomogramm des gesamten Felsenbeinpräparates mit einer Ortsauflösung (pixel size) von 27  $\mu\text{m}$  generiert. Die Messzeit betrug bei Felsenbein A 20 min und bei Felsenbein B, bedingt durch das größere Präparatvolumen, 30 min.

#### **3.7.4 Arbeitsprotokoll und Datenarchivierung**

Das eigens entwickelte Arbeitsprotokoll diente der Dokumentation der durchgeführten Versuche sowie der Datenarchivierung im Rahmen der Optimierung der Gefrierschliffpräparation und der Machbarkeitsstudie des „Tissue Printing“-Verfahrens mit der anschließenden immunhistochemischen Färbung. Es beinhaltet sowohl Angaben zur Probenvorbereitung und Versuchsdurchführung als auch zur mikroskopischen Dokumentation der einzelnen Gefrierschliffe und „Tissue Prints“ und ist beispielhaft in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Arbeitsprotokollbeispiel zur Machbarkeitsstudie des „Tissue Printing“-Verfahrens an kryofixierten und -geschliffenen Felsenbeinpräparaten (FB = Felsenbeinpräparat; SM = Stereomikroskop; TP = „Tissue Print“)

Arbeitsprotokoll (fortlaufende Nr.: 72)		
Präparatbezeichnung	Cochlea, Felsenbeinpräparat B (FB-B)	
Präparation durch	Prof. Pau	am: 26.06.2009
Fixierung	nativ / in 0,9%iger NaCl-Lösung kryofixiert	
Dokumentation:		
- Mikro-CT: Datum / Verbleib	- 01.07.2009 / CD-ROM	
- Makrofotografie: Datum / Verbleib	- 02.07.2009 / CD-ROM	
<b>Schleifvorgang</b>	Datum: 04.08.2009	Uhrzeit: 15:40 Uhr
vorherige Wasserauffüllung / Lagerung / Dauer der Zwischenfrierung	erfolgt / CO <sub>2</sub> solid / 20 min	
Körnung des SiC-Schleifpapiers	2400er Körnung	
Schliffebene: fortlaufende Nr.	72	
Schliffebenenabstand (zur vorangegangenen Ebene)	50 µm	
Dokumentation:		
Methode / Anzahl der Aufnahmen / Verbleib / Nomenklatur	Stereomikroskopie mit digitaler Fotografie / 4 Aufnahmen / CD-ROM / 2009.08.04_FB-B_nativ_SM_72_1 bis 4	
<b>„Tissue Printing“</b>		
Verwendeter Printräger	Optitran™-verstärkte Nitrocellulosemembran	
Glycerolbenetzung:		
Konzentration / Dauer	40% / 2 s	
Anpresszeit / Anpressdruck	30 s / 2,6 N/mm <sup>2</sup>	
Qualität des physikalischen Prints	gut	
Nomenklatur (Nr._Datum)	72_2009.08.04	
Dokumentation:		
Methode / Anzahl der Aufnahmen / Verbleib / Nomenklatur	Stereomikroskopie mit digitaler Fotografie / 7 Aufnahmen / CD-ROM / 2009.08.04_FB-B_nativ_SM_TP72_1 bis 7	
<b>Durchgeführte Färbung</b>	Datum: 05.08.2009	Uhrzeit: 15:00
Verfahren / detektiertes Protein	Indirekte Immunfluoreszenz / Kollagen Typ IV	
Dokumentation:		
Methode / Anzahl der Aufnahmen / Verbleib / Nomenklatur	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie / 54 Aufnahmen / CD-ROM / 2009.08.05_FV1000_TP72_Col4A_1 bis 54	
Bearbeiter	Svea Mühlig	

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kryoschliffpräparation und „Tissue Printing“ bei in-situ liegender Elektrode

Vor dem ersten Schleifvorgang wurde das Felsenbeinpräparat A angetaut, damit die Insertion einer Simulations-Elektrode in die Scala tympani erfolgen konnte. Nach erfolgter Insertion wurde das Präparat sofort wieder bei  $-21^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt. Durch die vor der Tiefkühlung erfolgte Wasserauffüllung der intracochleären Hohlräume wurden sowohl die membranösen Strukturen als auch die Elektrode stabilisiert. Mit Hilfe der stereomikroskopischen Aufnahmen war eine genaue Lokalisation der implantierten Elektrode möglich (Abbildung 10). Während der Kryoschliffpräparation und des „Tissue Printings“ erfolgte, bedingt durch die mittels  $\text{CO}_2 \text{ solid}$  gewährleistete konstante Kühlung, keine Elektrodendislokation. Es konnten mittels der Kryoschliffpräparation somit gut beurteilbare und aussagekräftige Schliffebenen erzielt werden. In Abbildung 10 ist eine Schliffebene des Felsenbeinpräparates A nach erfolgter Kryoschliffpräparation dargestellt.

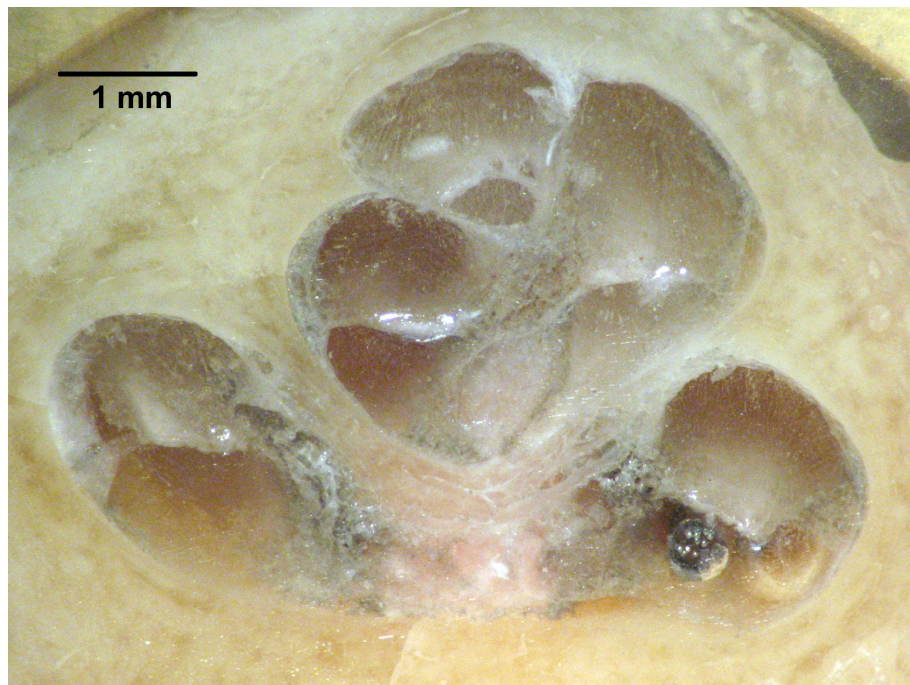


Abbildung 10: Humanes Felsenbeinpräparat A, Schliffebene Nr. 27 mit in der Scala tympani der basalen cochleären Windung liegender Elektrode (stereomikroskopische Aufnahme)

Während des Schleifens wurde ein gleichmäßiger Materialabtrag von cochleären Strukturen und der Elektrode erzielt. Der metallische Abrieb der Elektrode konnte während der Schliffpräparation jedoch nicht vollständig entfernt werden, sodass diese Rückstände teilweise durch das „Tissue Printing“ auf die Nitrocellulosemembran übertragen wurden. In Abbildung 11 ist ersichtlich, dass sich der Elektrodenabrieb besonders deutlich an den Reliefkanten des physikalischen Prints darstellte. Im Rahmen der bei der immunhistochemischen Färbung durchgeführten initialen Waschprozedur wurde dieser Abrieb größtenteils entfernt, so dass das Ergebnis nicht negativ beeinflusst wurde.

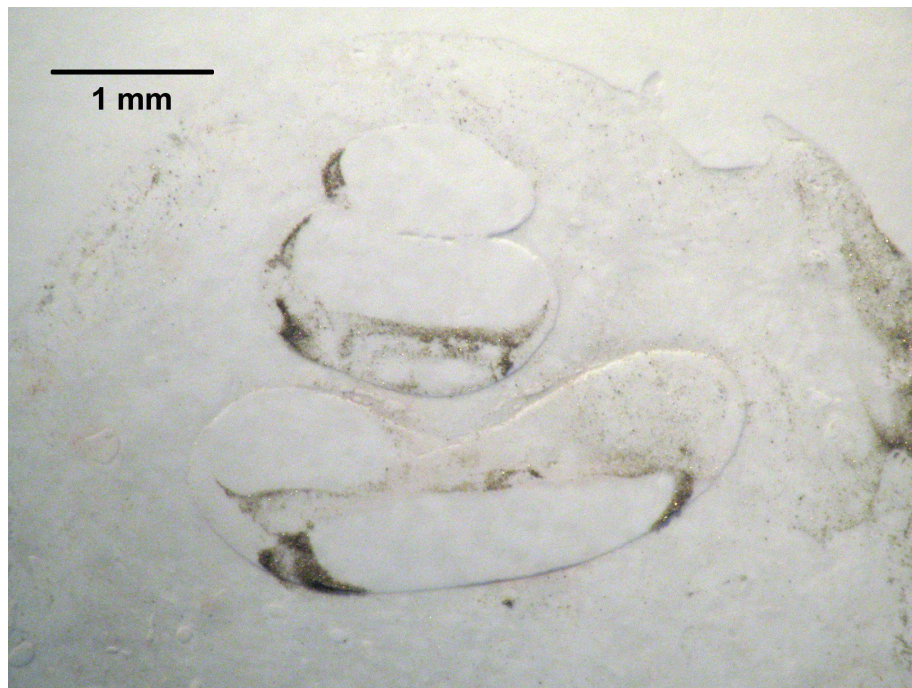


Abbildung 11: „Tissue Print“ Nr. 10 mit grünlich erscheinendem Elektrodenabrieb des humanen Felsenbeinpräparates A (stereomikroskopische Aufnahme)

## 4.2 Verfahrensoptimierung und Entwicklung einer Standardprozedur

Ziel der Verfahrensoptimierung war v.a. eine Maximierung der Anpresszeit zu erzielen. Einen wesentlichen Beitrag hierzu stellte die in den Kapiteln 3.3.2 und 3.3.3 beschriebene Entwicklung des Prototyps der KSV vom Typ II und deren Optimierung während der Kryoschliffpräparation des Felsenbeinpräparates B dar.

Der optimierte Prototyp ermöglichte ein präzises Schleifen mit definiert einstellbarem und leicht zu handhabendem Präparatvorschub unter Gewährleistung einer kontinuierlichen Isolierung des Kühlmittels und somit Kryofixierung des Felsenbeinpräparates.



In den Vorversuchen mit Felsenbeinpräparat A zeigte sich, dass bereits bei einer Anpresszeit von 5 s ein schonendes Trennen des Printrägers von dem Kryofelsenbeinpräparat nicht möglich war, was zu Schäden an der Printmembran führte. In der Abbildung 12 ist ein durch Anfrieren am Kryofelsenbeinpräparat bedingter Printmembranausriss dargestellt.

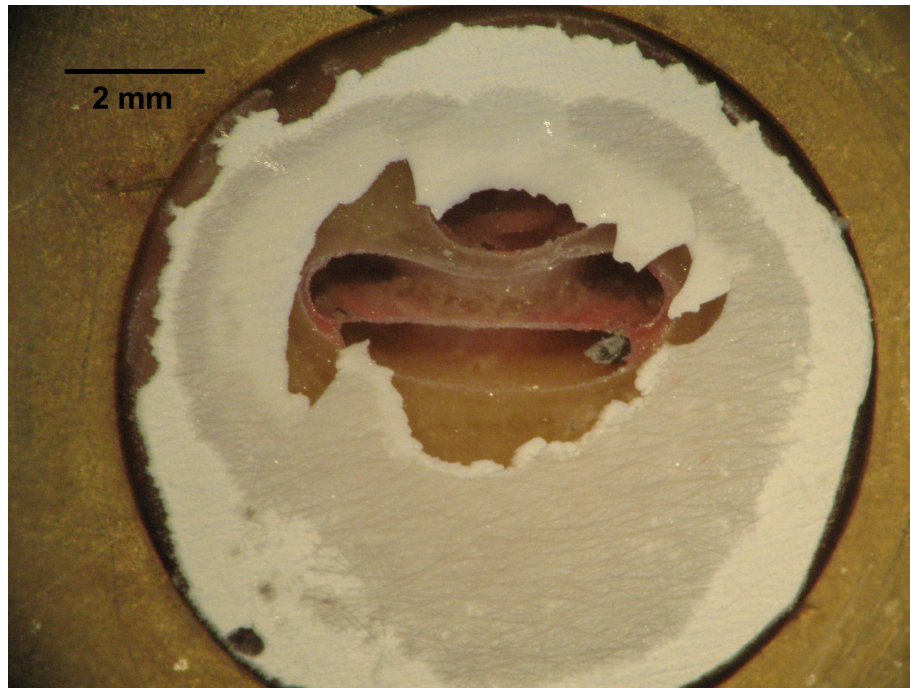


Abbildung 12: Humanes Felsenbeinpräparat A, Schliffebene Nr. 11 nach dem „Tissue Printing“ mit angefrorenen Resten der Nitrocellulose des Printrägers (stereomikroskopische Aufnahme)

Um ein Anfrieren der Nitrocellulosemembran an der Präparatschliffebene zu verhindern, wurde während der Durchführung des Gewebedruckes kurzzeitig der Gefrierpunkt an der Präparatoberfläche erniedrigt. Dies wurde durch die vorherige zweisekündige oberflächliche Spülung mit 70%igem Ethanol bzw. Benetzung mit einer Glycerollösung ermöglicht. Dadurch konnte die Printmembran auch nach Anpresszeiten > 5 s bei gleichzeitig gegebener kontinuierlicher Kryofixierung des gesamten Präparatvolumens schonend von dem Kryofelsenbeinpräparat entfernt werden. Dies ermöglichte die Herstellung gut beurteilbarer physikalischer und chemischer „Tissue Prints“.

#### 4.2.1 „Tissue Printing“ mit vorheriger Ethanolspülung

Durch die vor dem eigentlichen „Tissue Printing“ durchgeführte Spülung der Präparatschliffebene mit 70%igem Ethanol konnte die Anpresszeit auf 10 s verlängert werden. Bei einer Anpresszeit von 15 s kam es erneut zu einem Anfrieren der

Nitrocellulosemembran an der Schliffebene des Kryofelsenbeinpräparates. Obwohl eine Verlängerung der Anpresszeit erzielt werden konnte, führte die Spülung der Präparatoberfläche jedoch zu unerwünschten Nebenwirkungen. Durch den Spülprozess erfolgte ein laterales Abdriften der Proteine zum einen direkt auf der Präparatoberfläche und zum anderen, bedingt durch die starke Durchfeuchtung, innerhalb der Printmembran. Dies führte zu einer negativen Beeinflussung der Erzeugung physikalischer Prints und barg des Weiteren, wie in der Arbeit von *McGrath et al.* [179] beschrieben, die Gefahr eines unscharfen immunhistochemischen Signals. Abbildung 13 zeigt beispielhaft eine stark mit Flüssigkeit überdeckte Präparatschliffebene nach zweisekündiger Spülung mit Ethanol.

Diese nachteiligen Effekte konnte durch die Entfernung des Überschusses an 70%igem Ethanol von der Auflagefläche der KSV nicht ausreichend behoben werden.

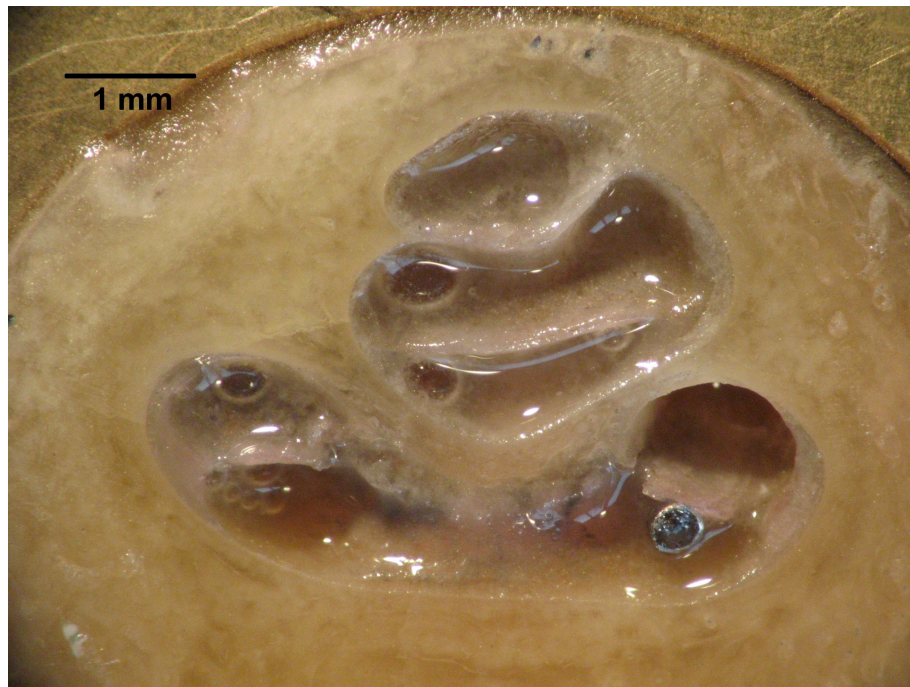


Abbildung 13: Humanes Felsenbeinpräparat A, Schliffebene 19 nach erfolgter Ethanolspülung (stereomikroskopische Aufnahme)

#### 4.2.2 „Tissue Printing“ mit vorheriger Glycerolbenetzung

Bei der Herstellung der „Tissue Prints“ Nr. 21 – 73 wurde die Präparatschliffebene der Kryofelsenbeinpräparate direkt vor dem eigentlichen „Tissue Printing“ für 2 s mit einer 30%igen bzw. 40%igen Glycerollösung benetzt. Durch die Zuhilfenahme eines textilen Trägers ließ sich die Präparatoberfläche sehr gut mit der Glycerollösung benetzen. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Glycerolkonzentrationen bezüglich der Qualität der physikalischen und später immunhistochemisch gefärbten Prints. Es konnte in allen Fällen eine Erniedrigung des Gefrierpunktes

an der Oberfläche des Kryofelsenbeinpräparates erzielt werden, so dass die Anpresszeit bis auf 55 s verlängert werden konnte.

Durch die höhere Viskosität des Glycerols gegenüber dem Ethanol kam es zu keinem lateralen Abdriften der Proteine auf der Präparatschliffebene und innerhalb der Printmembran. Somit konnten sowohl gut beurteilbare physikalische als auch chemische Prints erzeugt werden, was sich bei der späteren immunhistochemischen Färbung der „Tissue Prints“ anhand der guten Ortsauflösung des Fluoreszenzsignals zeigte.

#### **4.2.3 Verfahrensoptimierung durch Veränderungen des Zeitpunktes der Kühlmittelauffüllung sowie der Schleifpapierkörnung**

Während der Durchführung der Versuche erfolgte die Zwischenlagerung der in der KSV befindlichen Felsenbeinpräparate in einem mit  $\text{CO}_2_{\text{solid}}$ -gefüllten Dewargefäß. Die in Vorversuchen ermittelte Temperatur im Inneren dieses Gefäßes betrug  $-50^\circ\text{C}$ . Nach Beendigung dieser mindestens 15 min dauernden Zwischenfrierung schloss sich direkt die Kühlmittelauffüllung bzw. Kryoschliffpräparation an.

Bei der Herstellung der „Tissue Prints“ Nr. 21 – 43 wurde das Kühlmittel  $\text{CO}_2_{\text{solid}}$  direkt vor der Schliffpräparation in die KSV gefüllt. Die somit bedingte rasche Temperatursenkung (von ca.  $-50^\circ\text{C}$  auf  $-78,5^\circ\text{C}$ ) sowie die als Kristallisationskeime fungierenden Schleifpartikel führten während des Nassschleifens zur Bildung einer Eisschicht an der Präparatoberfläche sowie der Auflagefläche der KSV (Abbildung 14a). Die durch die anschließende Glycerolbenetzung bedingte Gefrierpunktserniedrigung führte zum Auftauen des Eises. Das Tauwasser begünstigte ein laterales Abdriften der Proteine an der Präparatoberfläche und führte zu einer zu starken Durchfeuchtung der Printmembran.

Die vermehrte Eisbildung konnte bei der Herstellung der „Tissue Prints“ Nr. 44 – 73 durch die auf den Zeitpunkt nach der Kryoschliffpräparation verlegte Kühlmittelauffüllung minimiert werden. Um während des Schleifens dennoch ein Arbeiten unter dem Gefrierpunkt zu gewährleisten, wurde die Schleifdauer auf maximal 10 s beschränkt. Für den nach einem Präparatvorschub nötigen umfangreicheren Materialabtrag und demzufolge länger dauernder Schliffpräparation erfolgte ein separater Schleifprozess mit aufgefülltem Kühlmittel.

Die z.T. noch nach der Kühlmittelauffüllung auf der Präparatschliffebene entstandenen Eiskristalle (Abbildung 14b) konnten bei der Durchführung der „Tissue Printings“ Nr. 53 – 73 durch zusätzliches einsekündiges Schleifen entfernt werden (siehe Abbildung 14c).



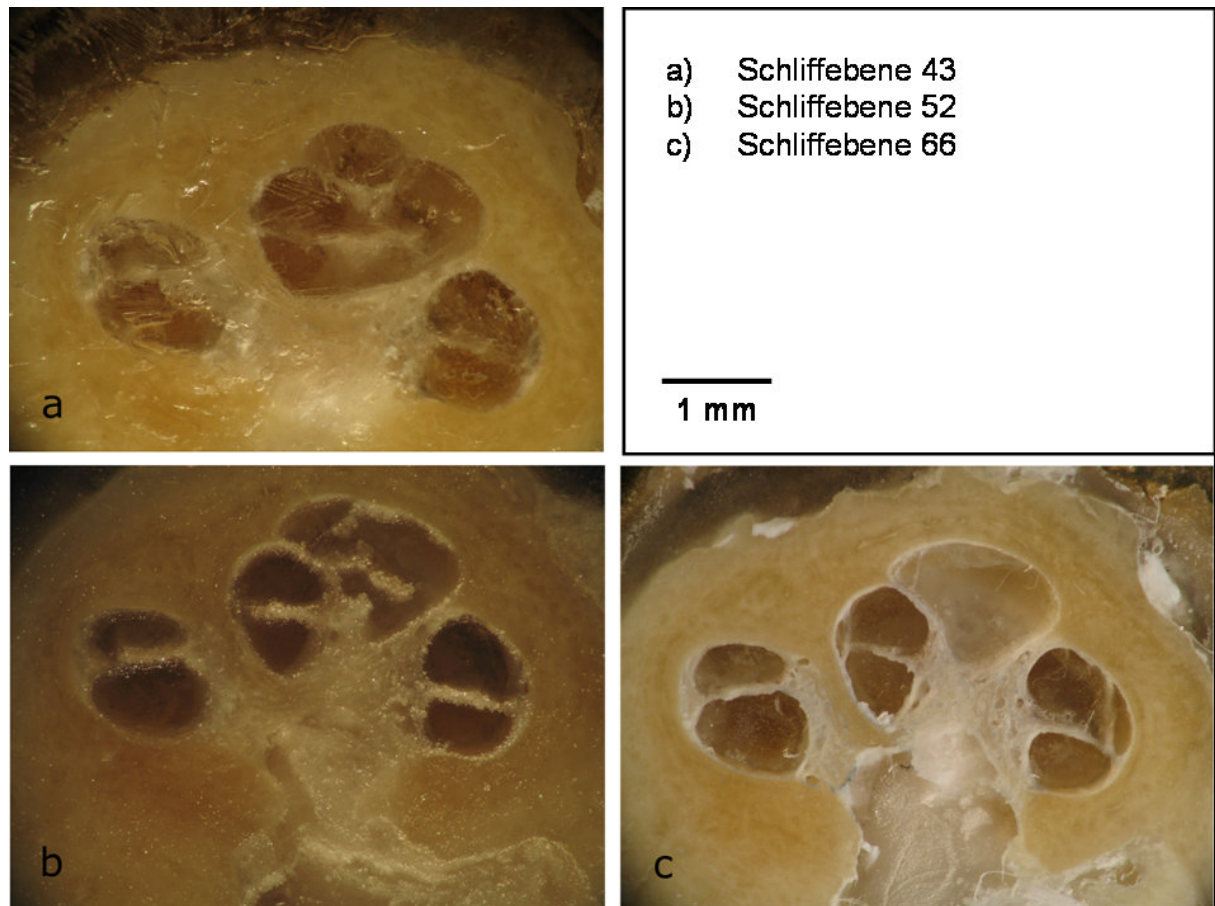


Abbildung 14: Humanes Felsenbeinpräparat B, Schleifebenen direkt vor der Benetzung mit Glycerol in verschiedenen Stadien der Verfahrensoptimierung: **a)** verstärkte Eisbildung bei  $\text{CO}_2 \text{ solid}$ -Auffüllung vor dem Schleifen, **b)** Eiskristallbildung nach der  $\text{CO}_2 \text{ solid}$ -Auffüllung, **c)** optimale Präparatschleifebene (stereomikroskopische Aufnahmen)

Eine weitere Optimierung des Verfahrens wurde durch die Verwendung von SiC-Schleifpapier mit einer Körnung von 2400 anstelle 1200 erreicht. Die feinere Körnung ermöglichte einen besseren Abtransport des Wassers mit dem darin enthaltenen Probenabrieb. Dies minimierte zum einen zusätzlich die Eisbildung auf der Auflagefläche der KSV und führte zum anderen zu weniger Übertrag des Probenabriebs auf die Printmembran.

Im Rahmen der Verfahrensoptimierung konnte somit eine Standardprozedur (Tabelle 15) entwickelt werden, die es ermöglicht, gut beurteilbare „Tissue Prints“ in beliebiger Anzahl herzustellen.

Dabei wurde durch die genannten Optimierungen der Kryoschleifvorrichtung sowie des Verfahrensablaufes eine Fixierung und kontinuierliche Kühlung des Felsenbeinpräparates sowohl während der Schliffpräparation als auch während des „Tissue Printings“ gewährleistet.

Tabelle 15: Standardprozedur für die Durchführung des „Tissue Printings“

	Erreichen einer neuen Schliffebene d.h.: der durch einen definierten Vorschub gewählte Präparatüberstand (im Bereich der Cochlea 50 µm) muss vollständig abgetragen werden
	<p>Auffüllen der KSV mit CO<sub>2</sub> solid</p> <hr/> <p>Kryoschliffpräparation:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li> <li>- SiC-Schleifpapier mit 2400er Körnung</li> <li>- Schleifdauer max. 41 s, bei Schleifdauer &gt; 41 s zur Gewährleistung einer kontinuierliche Kühlung erneute Auffüllung der KSV mit CO<sub>2</sub> solid</li> </ul> <hr/> <p>Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation der Präparatschliffebene</p> <hr/> <p>Präparat über das Niveau der Schleifvorrichtung verschieben, bis ein makroskopisch sichtbarer Überstand erreicht ist</p> <hr/> <p>Zwischenkühlung in einem CO<sub>2</sub> solid-gefüllten Dewargefäß für mindestens 15 min</p>
	Freilegen einer neuen Zellschicht zum Anfertigen beliebig vieler „Tissue Prints“ von der gewählten Präparatschliffebene
	<p>Kryoschliffpräparation zum Freilegen einer neuen Zellschicht:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li> <li>- SiC-Schleifpapier mit 2400er Körnung</li> <li>- Schleifdauer max. 10 s</li> </ul> <hr/> <p>Auffüllen der KSV mit CO<sub>2</sub> solid</p> <hr/> <p>Kryoschliffpräparation zum Entfernen von Eiskristallen auf der Präparatoberfläche:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Schleifgerät mit rotierender Schleifscheibe (Drehzahl 50 U/min) und reduzierter kontinuierlicher Wasserzufuhr</li> <li>- SiC-Schleifpapier mit 2400er Körnung</li> <li>- Schleifdauer 1 s</li> </ul> <hr/> <p>Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation der Präparatschliffebene</p> <hr/> <p>Präparatschliffebene mit Glycerolzelllösung für 2 s benetzen</p> <hr/> <p>„Tissue Printing“:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Optitran™-verstärkte Nitrocellulosemembran (Unterlage: Filterpapier)</li> <li>- Anpressdruck: 2,6 N/mm<sup>2</sup></li> <li>- Anpresszeit: 30 - 40 s</li> </ul> <hr/> <p>Stereomikroskopie und fotografische Dokumentation des „Tissue Prints“</p> <hr/> <p>Wasserauffüllung des Felsenbeinpräparates</p> <hr/> <p>Zwischenkühlung in einem CO<sub>2</sub> solid-gefüllten Dewargefäß für mindestens 15 min</p>

### 4.3 Klassifikation zur Beurteilung der Qualität der physikalischen „Tissue Prints“

Die physikalischen Tissue Prints wurden mittels Stereomikroskop untersucht und digital fotografisch dokumentiert. Anhand des Ausmaßes der Schäden der Printmembran, welche durch ein erschwertes Ablösen der Nitrocellulosemembran vom Kryofelsenbeinpräparat bedingt waren, wurden die physikalischen Prints klassifiziert. Grad 1 entsprach dabei einer sehr guten und Grad 5 einer nicht verwertbaren Printqualität. In der Abbildung 15 sind die in Tabelle 16 beschriebenen Qualitätsgrade beispielhaft dargestellt.

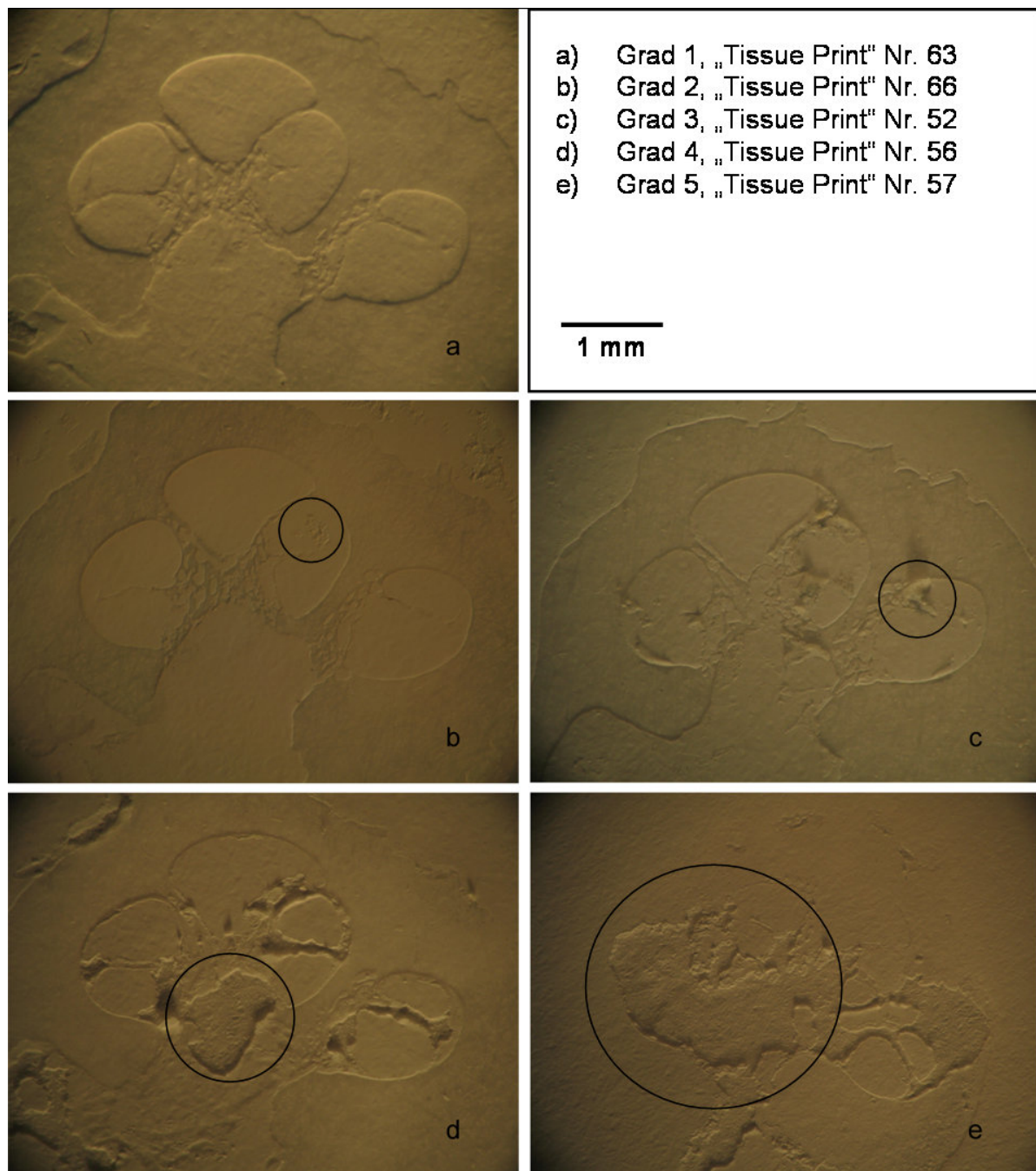


Abbildung 15: Übersicht der Qualitätsgrade physikalischer „Tissue Prints“ anhand des Ausmaßes der Printmembranschäden (stereomikroskopische Aufnahmen)

Tabelle 16: Klassifikation der Qualität der physikalischen Prints

Grad	Beschreibung möglicher Schäden der Printmembran	Qualität des physikalischen Prints
1	Keine Schäden der Printmembran	Sehr gut
2	Printmembranausrisse außerhalb des Bereichs cochleärer Strukturen oder in den Hohlräumen von Scala vestibuli sowie Scala tympani	Gut
3	Kleine Printmembranausrisse im Bereich cochleärer Strukturen	Befriedigend
4	Mittelgroße Printmembranausrisse im Bereich cochleärer Strukturen	Schlecht
5	Große Printmembranausrisse im Bereich cochleärer Strukturen	Nicht verwertbar
Ø	kein beurteilbarer physikalischer Print	Nicht verwertbar

Im Rahmen der Verfahrensoptimierung konnte die Anpresszeit bei der Durchführung des „Tissue Printings“ bis auf 55 s verlängert werden. Die Auswertung der erhaltenen Qualitätsgrade erbrachte jedoch, dass mit zunehmender Anpresszeit die Qualität der physikalischen Prints abnahm. Bei Anpresszeiten von 30 – 40 s konnten hingegen viele „Tissue Prints“ in sehr guter bis guter Qualität bei adäquatem Proteintransfer angefertigt werden.

Mittels Stereomikroskopie konnten die beim „Tissue Printing“ auf der Printmembran abgebildeten Reliefs der Schliffebenen humaner Kryofelsenbeinpräparate dreidimensional dargestellt werden, was anhand von „Tissue Print“ Nr. 44 beispielhaft in Abbildung 16 gezeigt ist. Diese Aufnahmen konnten bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der immunhistochemisch gefärbten Prints als hilfreicher Vergleich herangezogen werden.

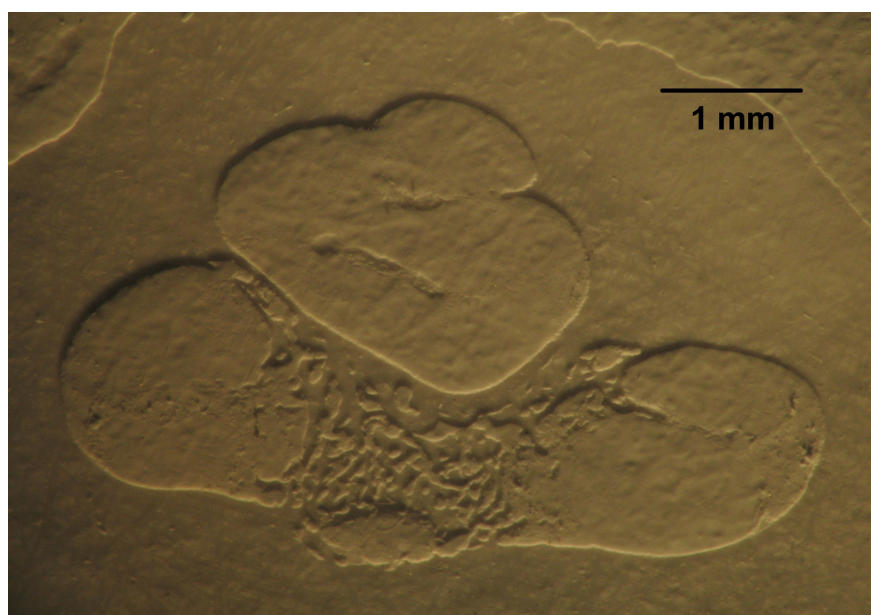


Abbildung 16: „Tissue Print“ Nr. 44 des humanen Felsenbeinpräparates B (stereomikroskopische Aufnahme)



Eine differenzierte Unterscheidung zwischen membranösen und knöchernen Strukturen gelang alleinig anhand der physikalischen Prints jedoch nur unvollständig, weshalb eine immunhistochemische Färbung der transferierten Proteine Kollagen Typ IV und Connexin 26 angeschlossen wurde.

#### 4.4 Immunhistochemische Färbung

Anhand der Klassifikation zur Beurteilung der Qualität der physikalischen „Tissue Prints“ wurden für Vorversuche zur immunhistochemischen Färbung die Prints von nur befriedigender oder schlechterer Qualität ausgewählt. Mit Hilfe dieser „Tissue Prints“ konnte gezeigt werden, dass das durch Ausrisse der Nitrocellulose freiliegende Polyester-Trägermaterial der Optitran™-Membranen nach erfolgter Färbung zu unspezifischen Fluoreszenzsignalen führt. Die Untersuchung mit dem CLSM ergab, dass bei der Verwendung intakter Printmembranen hingegen keine unspezifische Hintergrundfärbung detektierbar war. In der Abbildung 17 ist beispielhaft die fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme des immunhistochemisch gefärbten „Tissue Print“ Nr. 68 der entsprechenden stereomikroskopischen Aufnahme der Printmembran gegenübergestellt. Abbildung 17b zeigt deutlich das flächige, stark grün-fluoreszierende Signal im Bereich des Ligamentum spirale, in dem die Printmembran teilweise ausgerissen ist.

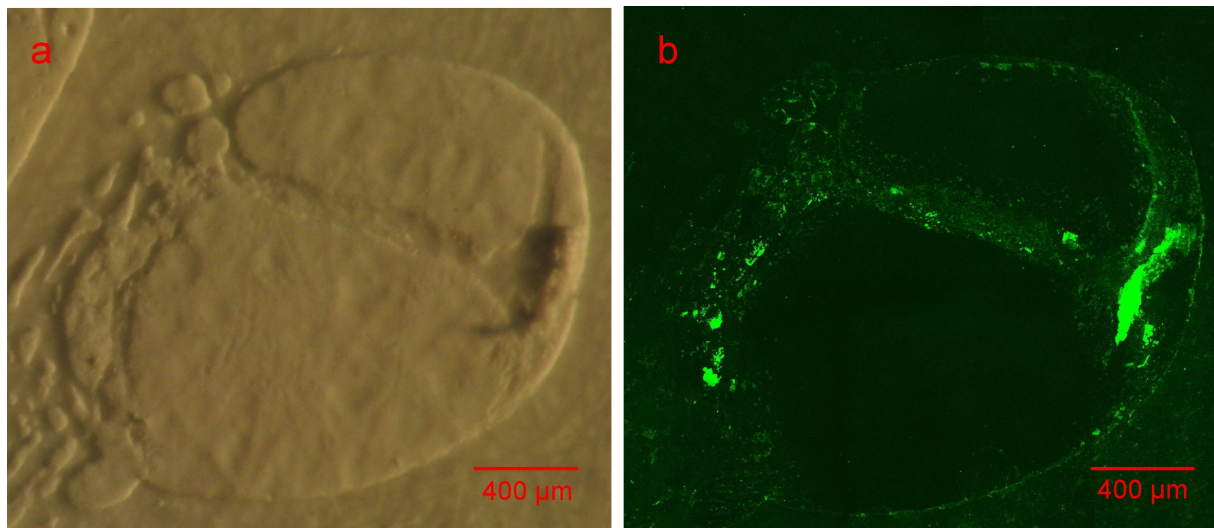


Abbildung 17: Printmembranausrisse des „Tissue Prints“ Nr. 68 im Bereich der basalen cochleären Windung des humanen Felsenbeinpräparates B: **a)** Ausrisse der Nitrocellulosemembran im rechten Bildbereich (stereomikroskopische Aufnahme); **b)** Unspezifisches flächiges Fluoreszenzsignal im rechten Bildbereich (Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV, CLSM-Aufnahme)

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden zur Vermeidung unspezifischer Fluoreszenzsignale mit Hilfe der Klassifikation zur Beurteilung der Qualität der physikalischen „Tissue Prints“ die Prints der Grade 1 und 2 selektiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz konnten die während des „Tissue Printings“ transferierten Proteine Kollagen Typ IV und Connexin 26 auf den ausgewählten Gewebeabdrücken der Gefrierschliffe des humanen Felsenbeinpräparates B mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen werden.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der in jeder Versuchsreihe mitgeführten Negativkontrollen war kein Signal detektierbar. Somit konnte gezeigt werden, dass die immunhistochemischen Nachweisreaktionen für Kollagen Typ IV sowie Connexin 26 spezifisch waren, und bei intakter Printmembran die detektierbare Fluoreszenz auf die Antigenlokalisation beschränkt war.

#### **4.4.1 Nachweis von Kollagen Typ IV**

Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 519 nm konnte unter Verwendung des grün-fluoreszierenden Sekundär-AK Alexa Fluor 488 das Kollagen Typ IV mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie dargestellt werden. In den Abbildungen 18 und 19 sind exemplarisch eine Übersichtsaufnahme und ein Ausschnitt der unteren basalen cochleären Windung des humanen Kryofelsenbeinpräparates B dargestellt. Die Abbildungen 18a und 19a zeigen in unterschiedlichen Vergrößerungen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten „Tissue Prints“ 38 und 69. Zur Beurteilung der Korrelation des Fluoreszenzsignals mit anatomischen Strukturen zeigen die Abbildungen 18b und 19b die entsprechenden im differentiellen Interferenzkontrast (DIC) dargestellten CLSM-Aufnahmen der „Tissue Prints“ 38 und 69.

Kollagen Typ IV konnte im Bereich epithelialer und vaskulärer Basalmembranen lokalisiert werden. In Abhängigkeit von der gewählten Schliffebene ließen sich epitheliale Basalmembranen der Basilarmembran sowie des, die Scalae vestibuli et tympani auskleidenden, Mesothels nachweisen (Abbildung 19a). Des Weiteren konnte je nach Schliffebene Kollagen Typ IV in vaskulären Basalmembranen der Stria vaskularis, des Ligamentum spirale und des Limbus spiralis dargestellt werden. Somit konnte eine deutliche Abgrenzung der knöchernen und membranösen cochleären Strukturen sowie eine Beurteilung der Membranintegrität erzielt werden. Die Reissner-Membran konnte präparationsbedingt nicht zur Darstellung gebracht werden.

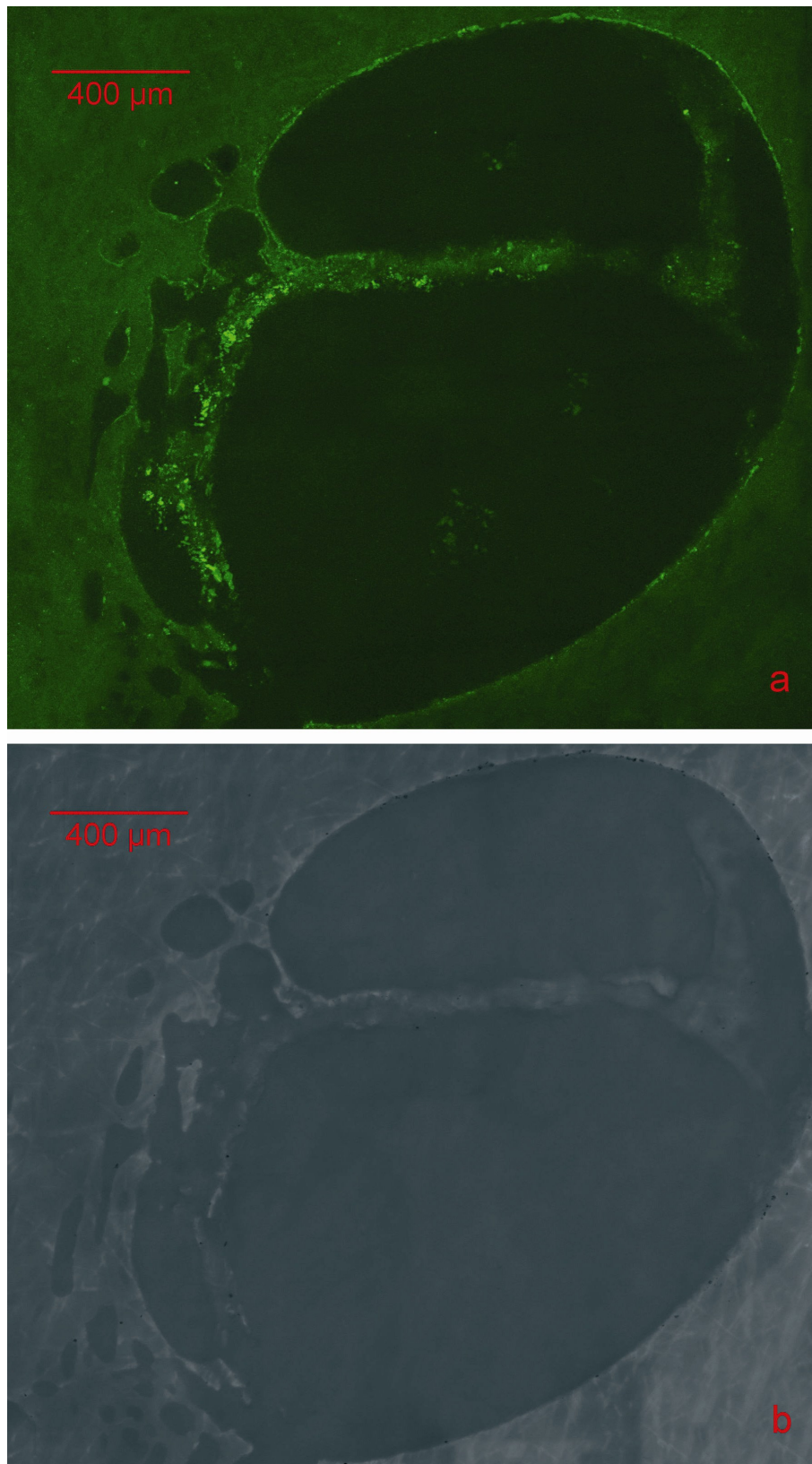


Abbildung 18: „Tissue Print“ Nr. 69 des humanen Felsenbeinpräparates B, Querschnitt der unteren basalen cochleären Windung, Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV: **a)** fluoreszenzmikroskopische CLSM-Aufnahme; **b)** CLSM-Aufnahme im differentiellen Interferenzkontrast

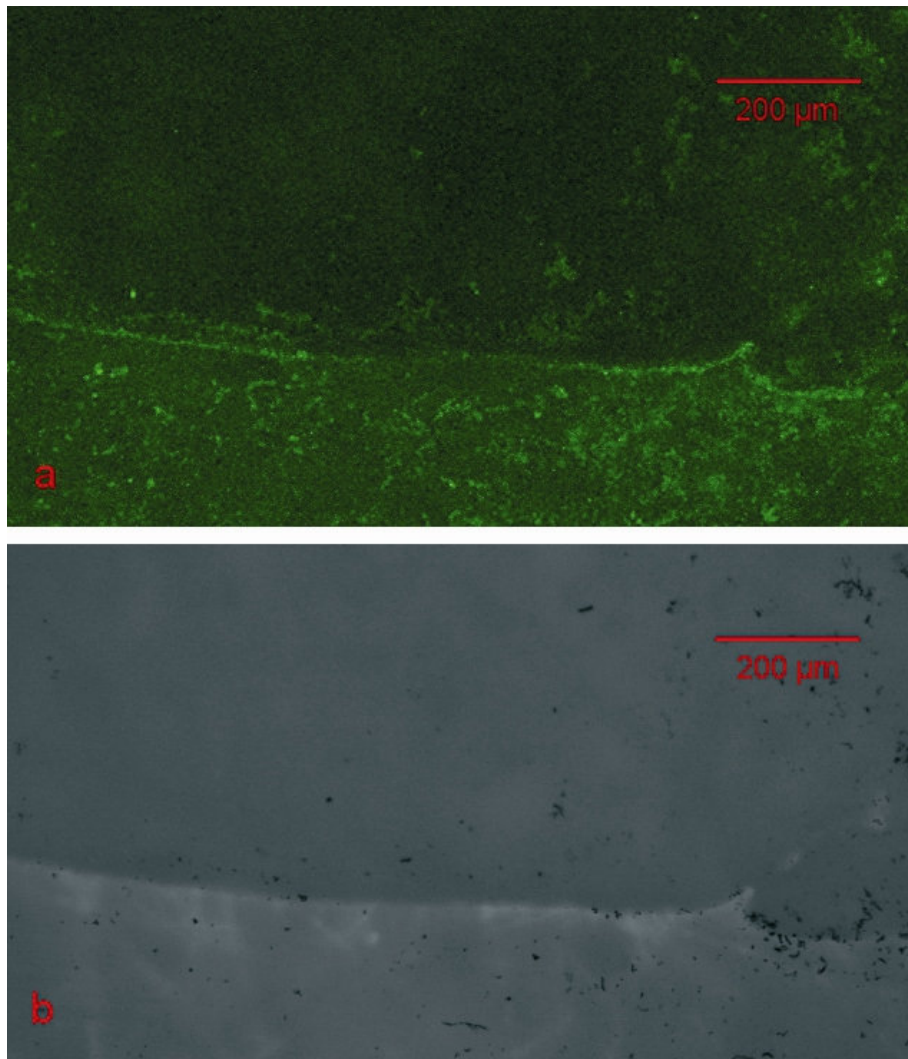


Abbildung 19: „Tissue Print“ Nr. 38 des humanen Felsenbeinpräparates B, Mesothel der Scala tympani, Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV: a) fluoreszenzmikroskopische CLSM-Aufnahme; b) CLSM-Aufnahme im differentiellen Interferenzkontrast

Der Vorversuch zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze für fluoreszenzmikroskopisch detektierbares Kollagen Typ IV ergab, dass bei Detektierung eines spezifischen Fluoreszenzsignals die Konzentration des beim „Tissue Printing“ transferierten Kollagens mindestens  $0,003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  betrug. Die gute Darstellbarkeit des Kollagen Typ IV in den immunfluoreszenzgefärbten „Tissue Prints“ spricht demnach für ein Überschreiten der genannten Mindestkonzentration.

#### 4.4.2 Nachweis von Connexin 26

Unter Verwendung des blau-fluoreszierenden Sekundär-AK Alexa Fluor 405 konnte das Protein Connexin 26 bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 422 nm mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie



dargestellt werden. Exemplarisch sind in der Abbildung 20 Ausschnitte des immunhistochemisch gefärbten „Tissue Prints“ 70 dargestellt.

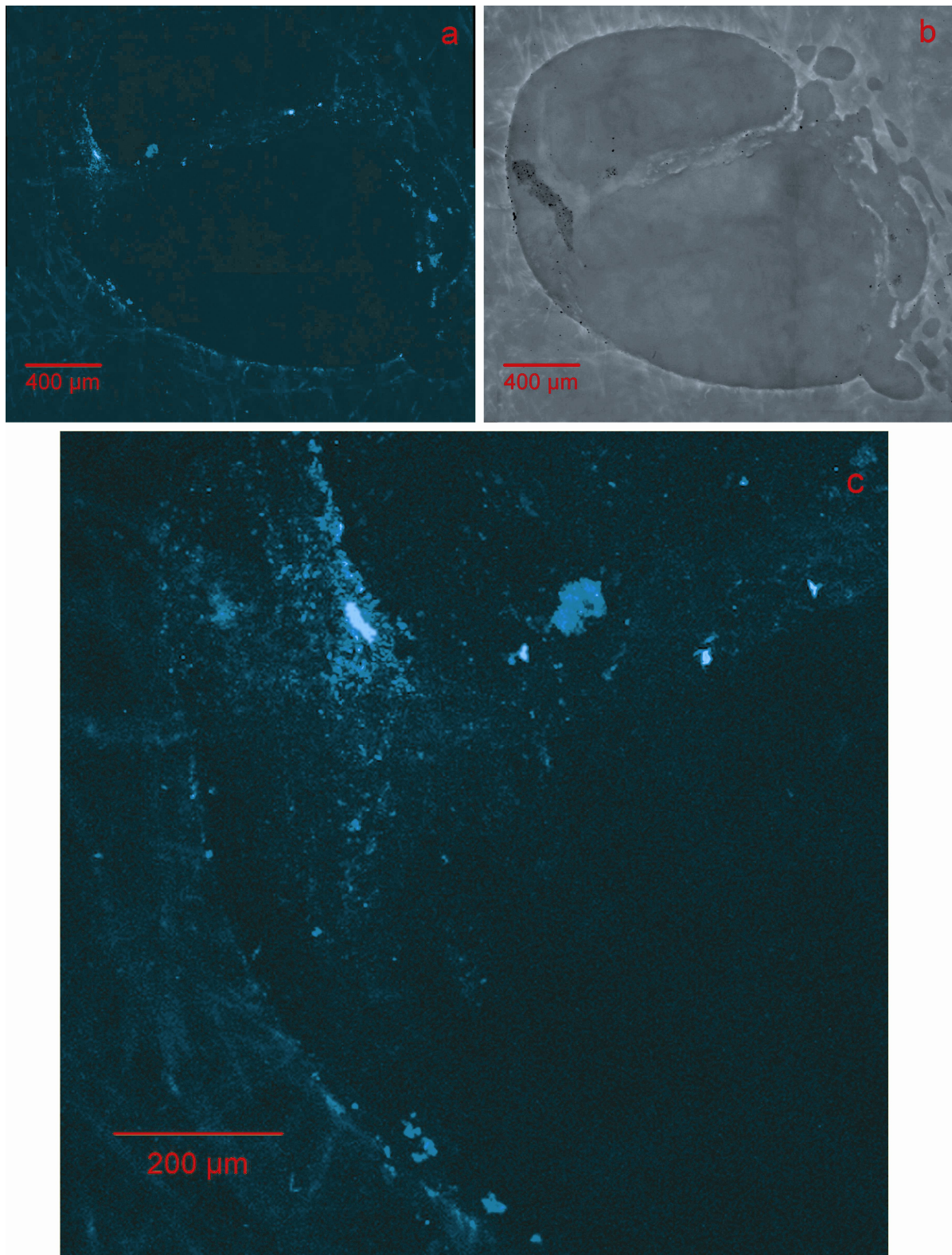


Abbildung 20: „Tissue Print“ Nr. 70 des humanen Felsenbeinpräparates B, Immunfluoreszenzfärbung von Connexin 26: **a)** fluoreszenzmikroskopische CLSM-Aufnahme; **b)** CLSM-Aufnahme im differentiellen Interferenzkontrast; **c)** Ligamentum spirale (fluoreszenzmikroskopische CLSM-Aufnahme)

Die Abbildungen 20a und 20b zeigen eine Gegenüberstellung der im Fluoreszenzmodus und mit differentiellm Interferenzkontrast (DIC) aufgenommenen Übersichtsdarstellungen des Querschnitts der unteren basalen cochleären Windung des humanen Kryofelsenbeinpräparates B. Connexin 26 ließ sich mittels Immunfluoreszenz besonders gut im Bereich des Ligamentum spirale und weiterer Strukturen der lateralen cochleären Wand darstellen (Abbildung 20c).

Da Connexin 26 im Wesentlichen nur im epithelialen Gap-junction-Netzwerk zwischen den Stützzellen des Corti-Organs sowie im bindegewebigen Gap-junction-Netzwerk der lateralen cochleären Wand exprimiert ist [46, 47], kann keine komplette Darstellung cochleärer Membranstrukturen ermöglicht werden. Mittels fluoreszenzmikroskopischen Nachweises von Connexin 26 konnte somit auch keine differenzierte Beurteilung der cochleären Membranintegrität erzielt werden.

Anhand des Nachweises von Kollagen Typ IV und Connexin 26 konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des optimierten „Tissue Printing“-Verfahrens auch beim Arbeiten im Gefrierbereich ein Proteinübergang auf die Printmembran möglich ist. Eine detaillierte Aussage über den Erhalt der cochleären Membranintegrität wird am besten über die Darstellung von Kollagen Typ IV gewährleistet.

#### **4.5 Dokumentationsmethoden zur Darstellung cochleärer Strukturen in den Präparatschliffebenen und „Tissue Prints“**

Vor der Kryoschliffpräparation wurde mittels eines hochauflösenden Mikro-Computertomographen (Mikro-CT) ein Tomogramm der noch unversehrten humanen Felsenbeinpräparate A und B erstellt. Die gewonnenen Daten wurden zu einem Volumendatensatz zusammengefügt, wodurch Schnittbilder und dreidimensionale Ansichten der Felsenbeinpräparate in beliebigen Ebenen rekonstruiert werden konnten.

Abbildung 21 zeigt beispielhaft ein dreidimensionales Modell des humanen Felsenbeinpräparates B, in dem die uneröffnete Cochlea im Inneren des Präparates zur Darstellung gebracht werden konnte. Dieses Modell bot eine hilfreiche räumliche Orientierung während der anschließenden Kryoschliffpräparation. Mit Hilfe des nicht-invasiven radiologischen Verfahrens der Mikro-Computertomographie konnten des Weiteren virtuelle Schnittbilder rekonstruiert werden (Abbildung 22), die den späteren Schliffebenen entsprachen und den stereo- sowie fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gleicher Ebene vergleichend gegenübergestellt werden konnten (Abbildung 23). Anhand der Mikro-CT-Schnittbilder konnten alle relevanten cochleären knöchernen Strukturen sowie die Basilarmembran dargestellt werden. Aufgrund der Auflösung des Mikro-CT von 27 µm

konnte eine differenzierte Darstellung membranöser Strukturen und die Beurteilung deren Integrität jedoch nicht erzielt werden.

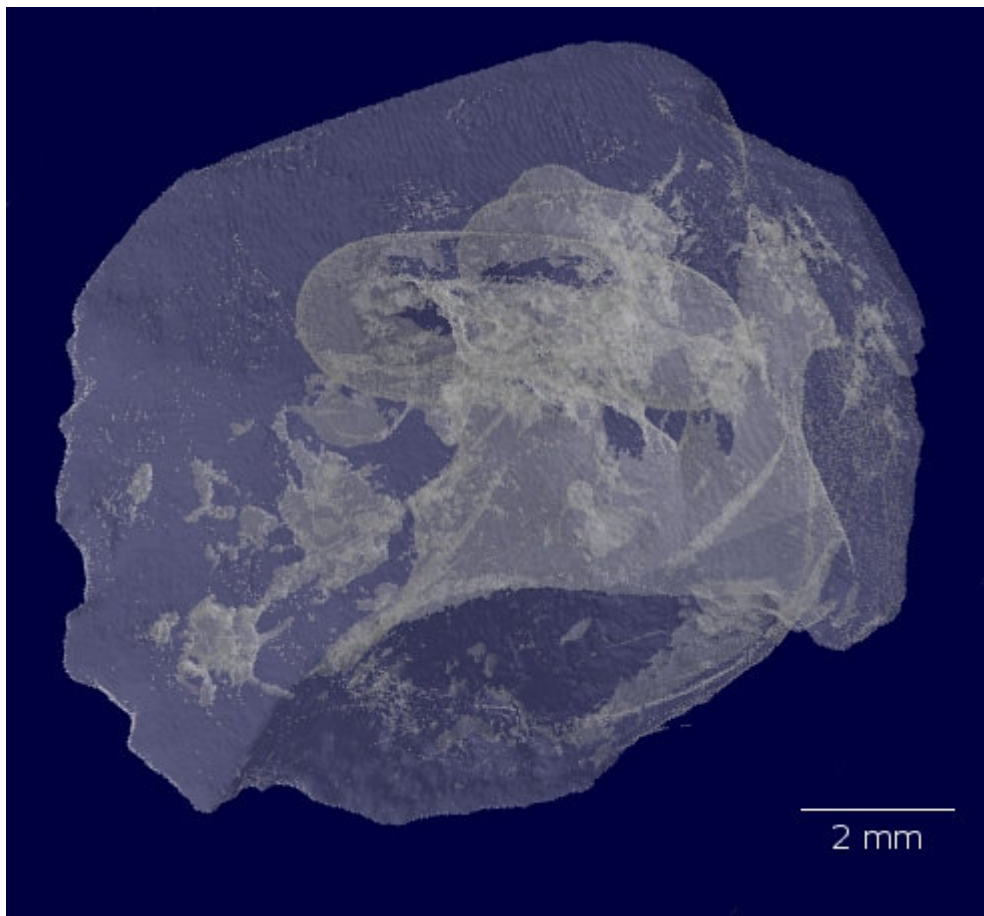


Abbildung 21: Humanes Felsenbeinpräparat B mit der im Inneren lokalisierten Cochlea (anhand Mikro-CT-Daten rekonstruiertes dreidimensionales Modell)

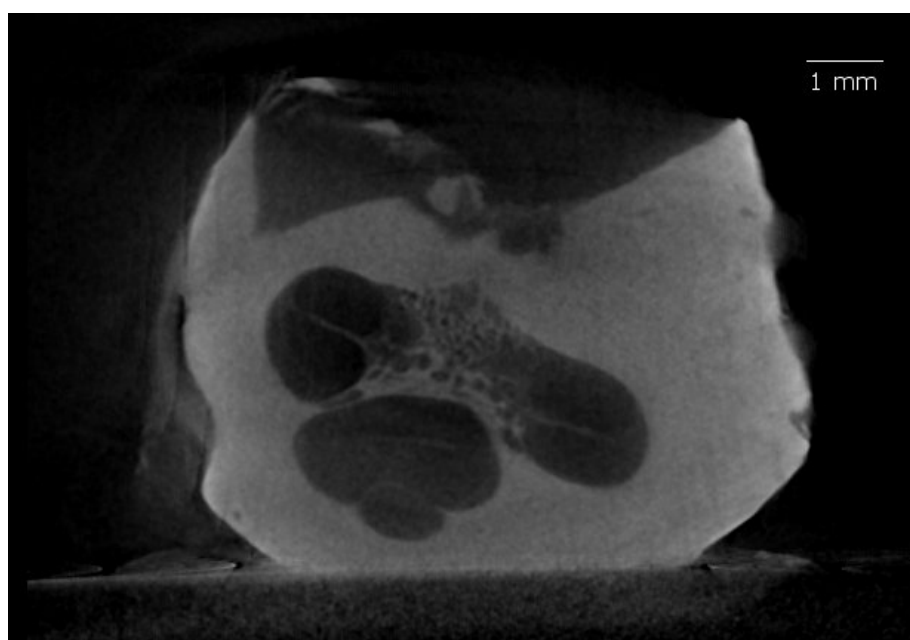


Abbildung 22: Humanes Felsenbeinpräparat B, Schnittbild (Mikro-Computertomogram)

Anhand der stereomikroskopischen Aufnahmen der humanen Kryofelsenbeinpräparate A und B konnte eine Lokalisierung und Differenzierung verschiedener cochleärer Strukturen (z.B.: Lamina spiralis ossea, Lamina basilaris, Ligamentum spirale) erzielt werden. Mit Hilfe der digital gespeicherten Bilddaten konnte nach erfolgter immunhistochemischer Färbung eines „Tissue Prints“ das detektierte Fluoreszenzsignal den anatomischen Strukturen der entsprechenden Schliffebene gegenübergestellt werden.

Die während des „Tissue Printings“ transferierten und immunfluoreszenzgefärbten Proteine Kollagen Typ IV und Connexin 26 konnten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie auf den „Tissue Prints“ nachgewiesen werden. Neben der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung konnte mit Hilfe des differentiellen Interferenzkontrastes (DIC) außerdem das Relief des physikalischen Prints in mikroskopischer Auflösung dargestellt und somit ebenfalls eine Korrelation der fluoreszierenden Antigenlokalisation mit anatomischen Strukturen ermöglicht werden.

In der Abbildung 23 sind anhand des Beispiels von Schliffebene 69 die in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden zur Dokumentation der Schliffebene und des entsprechenden „Tissue Prints“ gegenübergestellt.



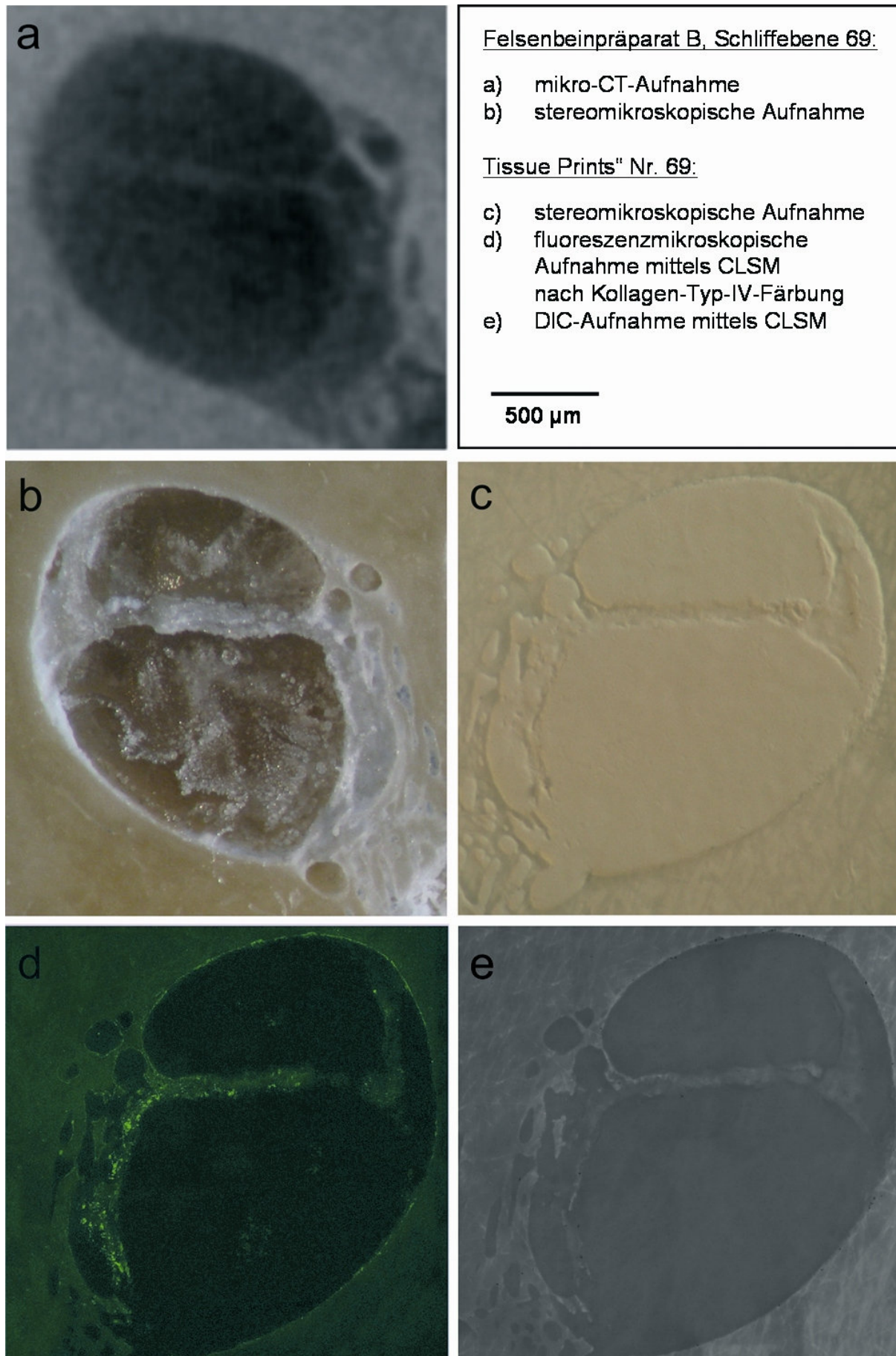


Abbildung 23: Übersicht der angewandten Dokumentationsmethoden

## 5 Diskussion

Ein Cochlear-Implantat (CI) gilt als ideal, wenn es durch direkte elektrische Reizung verschiedener Ganglienzellen des cochleären Ganglion spirale einen optimalen Höreindruck erzeugt und dabei möglichst atraumatisch implantiert werden kann. Zur Minimierung der implantationsbedingten Schädigungen cochleärer Strukturen werden daher kontinuierlich neue CI-Prototypen entwickelt, die vor ihrem klinischen Einsatz im Rahmen von Studien an Felsenbeinpräparaten auf ihre Tauglichkeit hin überprüft werden [25].

Um durch Präparation und histologische Aufarbeitung bedingte Artefakte zu vermeiden, wurde von *Herrmann et al.* [27] eine schonende Gefrierschlifftechnik entwickelt, mit der native, kryofixierte Felsenbeinpräparate mit in-situ liegender Elektrode untersucht werden konnten. Mit Hilfe dieser neuen Kryopräparationsmethode sollte die Beurteilung der Insertion eines endostealen Elektrodenmodells bezüglich eventuell verursachter Traumata optimiert werden. *Herrmann et al.* haben in diesem Zusammenhang des Weiteren erprobt, ob von einzelnen Gefrierschliffebenen der Kryofelsenbeinpräparate „Tissue Prints“ angefertigt werden können und ein immunhistochemischer Nachweis von Connexin 26 auf Printmembranen möglich ist. Die prinzipielle Machbarkeit dieses Verfahrens konnte zwar nachgewiesen werden, eine differenzierte Beurteilung der cochleären Membranintegrität wurde aufgrund der unzureichenden Anfärbbarkeit jedoch nicht gewährleistet [111, 182].

Bei der von *Lehnhardt et al.* [74] entwickelten endostealen Insertionsmethode wird die Elektrode zwischen dem häutigen und knöchernen Labyrinth lateral des Ligamentum spirale platziert, so dass keine Eröffnung des flüssigkeitsgefüllten Innenohres nötig ist. Durch diese schonende Insertion sollen mögliche Insertionstraumata und Infektionen vermieden werden können und das vorhandene Restgehör somit erhalten bleiben. Die hierfür erforderliche Wahrung der cochleären membranösen Integrität sowie die präparationstechnische Umsetzbarkeit konnten durch *Pau et al.* [107, 108] anhand von Insertionsversuchen mit simulierten Elektrodenträgern an formalinfixierten Felsenbeinpräparaten nachgewiesen werden. Eine differenzierte Beurteilung cochleärer Membranen im Hinblick auf insertionsbedingte Traumata wurde jedoch durch Trocknungsartefakte, welche im Rahmen der durchgeführten Kunststoffeinbettung auftraten, erschwert.

Mit dem in der vorliegenden Arbeit weiterentwickelten Kryoschleifverfahren konnte hingegen eine artefaktfreie Beurteilung cochleärer Strukturen erzielt werden.

In der aktuellen Literatur sind, mit Ausnahme der Arbeiten von *Herrmann et al.* [111, 182], keine Studien beschrieben, die das „Tissue Printing“-Verfahren zur Untersuchung kryofixierter und -geschliffener Gewebe anwenden. Die hier aufgeführten Ergebnisse können daher nur partiell mit den Ergebnissen anderer „Tissue Printing“-Untersuchungen verglichen werden.

Ganz allgemein ist zu sagen, dass chemische „Tissue Prints“ sowohl von pflanzlichen [z.B. 193, 194] als auch tierischen bzw. menschlichen [z.B. 195, 196] Geweben angefertigt werden können, wenn für den Molekültransfer im Wesentlichen zwei Bedingungen erfüllt sind: Zum einen ein möglichst planer, enger [193, 197] und langdauernder [164] Kontakt zwischen der Präparatoberfläche und dem Printträger und zum anderen eine Reaktionstemperatur oberhalb des Gefrierbereiches [179, 187, 193]. Die transferierten Moleküle können anschließend auf einer Printmembran mittels vielfältiger histochemischer oder immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden [161]. Bei letztgenannter Methode können sowohl Immunenzym- [z.B. 164, 179] als auch Immunfluoreszenztechniken [z.B. 194, 198] angewendet werden.

Im Gegensatz zu chemischen „Tissue Prints“, die unabhängig von der Festigkeit des Gewebes entstehen, werden physikalische „Tissue Prints“ in einer Printmembran nur durch solide Gewebe erzeugt [161, 164]. Als solide gelten hierbei durch Zellwände stabilisierte pflanzliche Gewebe sowie tierische bzw. menschliche Hartgewebe (Knochen, Dentin), die durch die Einlagerung von Mineralsalzen in die organische Matrix gefestigt werden. Bisher wurden physikalische „Tissue Prints“, die mit Hilfe mikroskopischer Untersuchungen histologische Strukturen detailliert zur Darstellung bringen können, im Wesentlichen nur von pflanzlichen Geweben angefertigt [161].

Im Rahmen des „Tissue Printings“ kryofixierter und -geschliffener Felsenbeinpräparate gelang es, aussagekräftige physikalische Prints auch von menschlichen Geweben zu erzeugen. So war mit Hilfe einer stereomikroskopischen Untersuchung die detaillierte Darstellung der cochleären *Scalae tympani et vestibuli* mit der *Lamina basilaris*, der *Lamina spiralis ossea*, dem *Ligamentum spirale* sowie der endostealen Region möglich.

## 5.1 Eignung des „Tissue Printing“-Verfahrens zur Beurteilung der cochleären Feinstruktur humaner Felsenbeinpräparate

### 5.1.1 Optimierung der Gefrierschliffmethode sowie des „Tissue Printing“-Verfahrens

In einer Studie der Firma *Cochlear*<sup>TM</sup> [199] wurden bei einigen elektrodeninsetierten Felsenbeinpräparaten cochleäre Traumata weitab der eigentlichen Elektrodenposition nachgewiesen. Als Ursache dieser Schäden wurde daher nicht die Elektrodeninsertion, sondern die gewählte Einbettmethode erachtet. Um eine sichere Unterscheidung zwischen insertions- und präparationsbedingten Traumata gewährleisten zu können, wurde deshalb auf die Bedeutung histologischer Untersuchungen an nativen, nicht-eingebetteten Felsenbeinpräparaten hingewiesen.

Im Vergleich zu standardisierten Einbettverfahren stellt die Kryoschliffpräparation eine schnelle und einfache Methode zur histologischen Untersuchung nativer Präparate dar [112, 113]. Durch die Kryofixierung von humanen Felsenbeinpräparaten konnten die besonders empfindlichen cochleären Strukturen derart stabilisiert werden, dass zum einen während der Kryoschliffpräparation keine Dislokation von Gewebestrukturen erfolgte und zum anderen durch die Druckeinwirkung beim „Tissue Printing“ ein dreidimensionales Relief der Präparatschliffebene in der Printmembran hervorgerufen wurde. Neben den cochleären Membranstrukturen konnte eine inserierte Simulations-Elektrode durch die Kryofixierung ebenfalls stabilisiert und somit vor einer Dislokation geschützt werden. Durch die mittels CO<sub>2</sub> solid gewährleistete sofortige Kryofixierung waren Untersuchungen des jeweiligen Felsenbeinpräparates unmittelbar nach der Elektrodeninsertion möglich. Mit der in der vorliegenden Arbeit gefertigten und weiterentwickelten Kryoschleifvorrichtung (KSV) vom Typ II konnte, im Vergleich zur KSV vom Typ I [111], die kontinuierliche Kühlung sowie Fixierung des Präparates optimiert werden.

Im Rahmen des „Tissue Printings“ wurden infolge des Molekültransfers von der Präparatschliffebene auf die Nitrocellulosemembran chemische Prints erzeugt. Von Interesse waren hierbei v.a. die transferierten Proteine, welche anschließend immunhistochemisch auf der Printmembran nachgewiesen werden konnten.

In den Arbeiten von *McGrath et al.* [179], *Mariac et al.* [187] und *Conley et al.* [193] wurden Gewebeabdrücke von Gefrierschnitten der verwendeten Präparate angefertigt. Der während des „Tissue Printings“ ablaufende Auftauprozess wurde dabei als entscheidender Antrieb für den Proteintransfer beschrieben. *Okabe et al.* [164] zufolge ist für den Transfer der Gewebeproteine auf die Printmembran ebenfalls die durch das Auftauen bedingte Permeation der zellulären Flüssigkeit in die Membranmatrix verantwortlich. Das Ausmaß des



Proteinübergangs ist dabei unabhängig von der gewählten Gefrierschnittdicke, da nur die Zelllage der angeschnittenen Fläche beim „Tissue Printing“ für einen Proteinübergang zugänglich ist.

Ziel der hier vorliegenden Untersuchung war, eine für den Proteintransfer erforderliche Temperaturerhöhung über den Gefrierpunkt im Bereich der Schliffebene zu erzielen und dabei gleichzeitig eine kontinuierliche Kryofixierung des restlichen Felsenbeinpräparates zu gewährleisten. Da die Menge an transferierten Proteinen mit größer werdender Anpresszeit zunimmt [164], sollte diese, unter Einhaltung der eben genannten Bedingungen, maximiert und ein schonendes Trennen der Printmembran vom Kryofelsenbeinpräparat garantiert werden.

Durch die Benetzung der Kryopräparatschliffebene mit einer 30%igen bzw. 40%igen Glycerollösung konnte der Gefrierpunkt oberflächlich erniedrigt [184] und somit ein Proteintransfer überhaupt ermöglicht werden. Im Gegensatz zu den „Tissue Printing“-Versuchen von *Herrmann* [111], in denen die Anpresszeiten auf 5 Sekunden limitiert war, konnte die Anpresszeit auf 55 s verlängert und die Menge an transferierten Proteinen somit vergrößert werden [164].

### 5.1.2 Immunhistochemischer Nachweis transferierter Proteine

Mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz gelang der Nachweis der Proteine Connexin 26 und Kollagen Typ IV, welche von der Kryopräparatschliffebene auf die Printmembran übertragen wurden.

Im Vergleich zur chemischen Präparatfixierung wird bei der Kryofixierung die Antigenität, das heißt die Fähigkeit einer Substanz als Antigen zu wirken, deutlich besser erhalten [112]. Dies wurde auch in den Arbeiten von *Herrmann et al.* [111, 182] als notwendige Voraussetzung für eine immunhistochemische Farbreaktion angeführt. *Herrmann et al.* wiesen Connexin 26 mittels indirekter Immunenzymtechnik in „Tissue Prints“ von Kryofelsenbeinpräparaten nach. Aussagen zur cochleären Strukturintegrität konnten aufgrund der unzureichenden Anfärbbarkeit jedoch nur begrenzt getroffen werden [111, 182]. Als Ursache hierfür ist am ehesten ein zu geringer Antigengehalt der Printmembran zu erachten.

Durch die in der vorliegenden Studie erarbeitete Verfahrensoptimierung konnte der Proteintransfer verbessert und so der Antigengehalt auf der Printmembran erhöht werden. Die resultierende Qualitätssteigerung der immunhistochemischen Reaktion ermöglichte eine verbesserte Beurteilung der Strukturintegrität humaner Felsenbeinpräparate anhand immunfluoreszenzgefärbter „Tissue Prints“.

#### 5.1.2.1 Nachweis von Connexin 26 in der Cochlea

Die Gap-junction-Proteine Connexin 26 (Cx26) und Connexin 30 (Cx30) kommen in der Cochlea besonders häufig vor [46, 47]. *Kikuchi et al.* [46] haben anhand immunhistochemischer und ultrastruktureller Analysen muriner Cochleae dabei die voneinander unabhängigen epithelialen (zwischen den Stützzellen des Corti-Organs) und bindegewebigen (zwischen den Zellen des Bindegewebes der lateralen cochleären Wand) Gap-junction-Netzwerke identifiziert.

Mit Hilfe des Nachweises von Cx26 in immunfluoreszenzgefärbten „Tissue Prints“ konnte das Ligamentum spirale, dessen Integrität für die endosteale Elektrodeninsertion wesentlich ist, dargestellt werden. Eine genaue Differenzierung zwischen den Zellen der Stria vascularis und den Bindegewebszellen der lateralen cochleären Wand, wie sie in der Arbeit von *Liu und Zhao* [54] beschrieben wurde, gelang jedoch nicht. Das epitheliale Gap-junction-Netzwerk konnte anders als in der Untersuchung von *Zhao und Yu* [47] nur unvollständig zur Darstellung gebracht werden. Die Ursache für die abweichenden Ergebnisse liegt in den unterschiedlichen Präparationsmethoden begründet. Für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten *Liu und Zhao* [54] Gewebeschnitte von dekalzifizierten, in Gelatine eingebetteten Cochleae. *Zhao und Yu* [47] fertigten sog. „Whole-mount-Präparate“ an, bei denen das Corti-Organ nach Entfernung der umliegenden Strukturen im Ganzen entnommen und nicht sektioniert wurde. Damit waren die für eine immunhistochemische Färbung zur Verfügung stehenden Zell- und Proteinmengen deutlich größer als diejenigen, welche beim „Tissue Printing“ auf die Printmembran übertragen wurden. Bei der anschließenden Untersuchung mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop resultierte die größere Proteinmenge in einem intensiveren Fluoreszenzsignal und somit einer besseren Differenzierbarkeit als in der vorliegenden Studie.

#### 5.1.2.2 Nachweis von Kollagen Typ IV in der Cochlea

Mit Hilfe des fluoreszenzmikroskopischen Nachweises von Kollagen Typ IV in immunhistochemisch gefärbten „Tissue Prints“ konnte eine deutliche Abgrenzung der knöchernen und membranösen cochleären Strukturen sowie eine detaillierte Aussage über den Erhalt der cochleären Membranintegrität erzielt werden.

Kollagen Typ IV konnte im Bereich epithelialer und vaskulärer Basalmembranen zur Darstellung gebracht werden, wodurch die Ergebnisse der Untersuchungen von *Takahashi und Hokunan* [38] sowie *Sato et al.* [39] (siehe Kapitel 2.2.1) im Wesentlichen bestätigt werden konnten. In Abhängigkeit von der gewählten Schliffebene ließen sich Basalmembranen der Basilarmembran, der Gefäße der Stria vascularis, des Ligamentum spirale und des Limbus spiralis nachweisen.

*Takahashi und Hokunan* [38] führten den immunhistochemischen Nachweis von Kollagen Typ IV mittels der Streptavidin-Biotin-Peroxidasereaktion an in Paraffin eingebetteten dekalzifizierten Innenohren von Meerschweinchen durch. Dabei erfolgte kein bzw. ein nur sehr schwacher Nachweis von Kollagen Typ IV im Bereich der mesothelialen Basalmembran der Scalae tympani et vestibuli. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Struktur hingegen deutlich dargestellt werden (siehe Abbildungen 18 und 19, Kapitel 4.4.1).

*Satoh et al.* [39] wiesen Kollagen Typ IV mittels indirekter Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten von formalinfixierten, dekalzifizierten murinen Cochleae nach. Neben den oben beschriebenen Lokalisationen konnte Kollagen Typ IV dabei auch in der Reissner-Membran nachgewiesen werden. In den in der vorliegenden Arbeit angefertigten „Tissue Prints“ konnte die Reissner-Membran hingegen präparationsbedingt nicht zur Darstellung gebracht werden. Da für das „Tissue Printing“ native, unfixierte humane Felsenbeinpräparate verwendet wurden, sind leichte Veränderungen durch autolytische Prozesse nicht sicher auszuschließen, welche einen Zusammenbruch der Membran post-mortem verursacht haben könnten. *Satoh et al.* verwendeten für ihre Studie Cochleae von anästhesierten Ratten, die vor ihrer Tötung mit einer Perjodat-Lysin-Paraformaldehyd-Lösung transaortal perfundiert und somit fixiert worden sind. Es ist anzunehmen, dass durch die bereits pre-mortem eingeleitete Präparatfixierung die Reissner-Membran, wenn z.T. auch deformiert, bewahrt und daher in den angefertigten Gefrierschnitten dargestellt werden konnte.

### **5.1.3 „Tissue Printing“ kryofixierter und -geschliffener Felsenbeinpräparate als Methoden zur Evaluation der Elektrodeninsertion an post-mortem Felsenbeinpräparaten**

Zur Evaluation elektrodeninsertionsbedingter cochleärer Traumata existieren bereits zahlreiche Studien, in denen histologische Untersuchungen zumeist an eingebetteten Felsenbeinpräparaten durchgeführt wurden. Die Methoden und Ergebnisse der verschiedenen Autoren, welche in Kapitel 2.7 bereits ausführlich erläutert wurden, sollen im Folgenden mit dem Verfahren des „Tissue Printings“ kryofixierter und -geschliffener Felsenbeinpräparate verglichen werden.

*Shepherd et al.* [119], *Kennedy* [120], *O’Leary et al.* [121] und *Welling et al.* [122] verwendeten zur histomorphologischen Aufarbeitung von Felsenbeinen die Methode der Dekalzifizierung mit anschließender Paraffineinbettung und Anfertigung von Schnittpräparaten. Da ein Belassen des Elektrodenträgers in-situ zu schnittpräparationsbedingten Artefakten führen würde, musste dieser während des Präparationsprozesses entfernt werden, so dass er im endgültigen Präparat nicht mehr darstellbar war [104].

Mit dem Verfahren der Kryoschliffpräparation können hingegen Felsenbeinpräparate mit implantierter Elektrode untersucht und Aussagen zur intracochleären Elektrodenlokalisierung getroffen werden. Durch die kombinierte Anwendung des „Tissue Printing“-Verfahrens können des Weiteren zusätzliche Informationen über mögliche insertionsbedingte Traumata gewonnen werden.

Um das Schneiden von Felsenbeinpräparaten mit in-situ liegender Elektrode zu ermöglichen, wurde von *Lehnhardt* [127], *Gstoettner et al.* [124, 125] und *Adunka et al.* [23, 25, 139] das histologische Präparationsverfahren der Hartschlifftechnik eingesetzt. Dafür wurden die formalinfixierten Präparate dehydriert, in Polymethylmethacrylat (PMMA) eingebettet, geschnitten und geschliffen. *Richter et al.* [128] verwendeten für die histologische Untersuchung native gefrorene Felsenbeinpräparate, welche kurz vor der Elektrodeninsertion aufgetaut wurden. Anschließend wurden die Felsenbeinpräparate mit implantierter Elektrode mit Formalin fixiert, dehydriert, in Methylmethacrylat (MMA) eingebettet und schließlich, wie bei der Einbettung in PMMA, mittels Hartschlifftechnik präpariert. Die Methode der MMA-Einbettung zur Evaluation der Elektrodeninsertion wurde auch in weiteren Studien von *Richter et al.* [104, 133] sowie *Klenzer et al.* [106] und *Aschendorff et al.* [132] angewandt. Anstelle von PMMA bzw. MMA kann auch Epoxydharz für die Kunststoffeinbettung genutzt werden. *Pau et al.* [107, 108] und *Stöver et al.* [135] verwendeten aldehydfixierte Felsenbeinpräparate, welche nach Elektrodeninsertion dehydriert, in Epoxydharz eingebettet und ebenfalls mittels Hartschlifftechnik aufgearbeitet wurden.

Die mittels Hartschlifftechnik gewonnenen Schliffpräparate wurden anschließend histologisch gefärbt und mikroskopisch untersucht. Dabei konnten die genaue Position der implantierten Elektrode bestimmt, cochleäre Strukturen hochauflösend dargestellt sowie mögliche Insertionstraumata beurteilt werden.

Als Nachteile der Kunststoffeinbettung werden der hohe zeitliche Aufwand [135] und die im Rahmen der Präparateinbettung entstehenden Artefakte [25, 108, 128, 139] beschrieben. Hierfür beispielhaft zu nennen sind Trocknungsartefakte mit Schrumpfung und lateraler Ablösung der die Skalen umhüllenden Weichteilstrukturen [108] sowie eine Schwellung des Elektrodenträgers, welche *Richter et al.* [128] zufolge auf eine chemische Reaktion der Silikonummantelung des Elektrodenträgers mit dem Einbettmedium zurückzuführen ist.

Um das Ausmaß dieser präparationsbedingten Schwellungsartefakte zu verifizieren, haben *Adunka et al.* [25, 139] die Elektrodenträgerdurchmesser an definierten Stellen vor und nach dem Einbetten bestimmt. Die in den histologischen Schnittpräparaten erfolgte Messung erbrachte dabei eine Zunahme des Elektrodenträgerdurchmessers um bis zu 20% [25]. In

einer Studie zur perimodiolaren CI-Insertion haben *Adunka et al.* [139] 16 in Kunststoff eingebettete Felsenbeinpräparate verwendet, welche mittels Hartschlifftechnik aufgearbeitet und bezüglich insertionsbedingter Traumata histologisch untersucht wurden. In der Beschreibung der Traumatisierung wurde dabei zwischen drei verschiedenen Entstehungsmechanismen unterschieden: Cochleostomiebohrung, Abknickung des Elektrodenträgers bei der Insertion sowie Artefakte aufgrund einer präparationsbedingten Schwellung des Elektrodenträgers. In 75% der untersuchten Felsenbeine (12 von 16) waren Traumata nachweisbar, wobei in 42% dieser Fälle (5 von 12) ein eindeutiger Hinweis auf Schwellungsartefakte zu sehen war.

Im Gegensatz zur Kunststoffeinbettung ermöglicht die Kryoschliffpräparation mit anschließendem „Tissue Printing“ ein natives Belassen und somit eine artefaktfreie Beurteilung der Felsenbeinpräparate.

Ein weiterer Nachteil bei der Anwendung der Hartschlifftechnik ist, dass von den in Kunststoff eingebetteten Felsenbeinen vor der eigentlichen Schleifprozedur zunächst Schnittpräparate angefertigt werden müssen. Da die Schnittdicke hierbei recht groß gewählt werden muss, können pro Cochlea nur ca. 6 – 10 Präparate hergestellt werden. Anschließend können diese Präparate geschliffen und histologisch aufgearbeitet werden [123].

Die Kryoschliffpräparation ermöglicht hingegen eine kontinuierliche Präparation in  $\mu\text{m}$ -Schritten, so dass die Anzahl der untersuchten Schliffebenen nicht limitiert ist. Durch das erneute Anschleifen einer Präparatschliffebene kann eine frische Zellschicht eröffnet werden, welche für einen erneuten Proteintransfer zur Verfügung steht [164]. Dies ermöglicht die Herstellung einer großen Anzahl „Tissue Prints“ aus einem Felsenbeinpräparat.

*Eshraghi et al.* [134] wendete zur Evaluation cochleärer Traumata nach Elektrodeninsertion eine Gefrierschnitttechnik an, bei der 10  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte von Kryofelsenbeinpräparaten angefertigt wurden. Dabei konnte eine Untersuchung von Felsenbeinen mit in-situ liegender CI-Elektrode ermöglicht werden, ohne das Risiko von präparationsbedingten Artefakten, wie sie bei der Kunststoffeinbettung auftreten, in Kauf nehmen zu müssen. Da nach erfolgter Gefrierschnittpräparation jedoch keine Kühlung der Schnittpräparate mehr gewährleistet werden konnte, erfolgte eine rasche mikroskopische Untersuchung und fotografische Dokumentation ohne vorherige histologische Färbung. Eine genaue Differenzierung zwischen knöchernen und membranösen Strukturen war daher nicht gegeben.

Die bei fehlender Kühlung unmögliche Bewahrbarkeit von histologischen Strukturen in Kryoschnittpräparaten stellt einen wesentlichen Nachteil der Methode dar [134]. Bei Anwendung der Kryoschlifftechnik sind die histologischen Strukturen ebenfalls nicht dauerhaft bewahrbar, wobei dies nicht auf eine fehlende Kryofixierung, sondern auf den

schliffpräparationsbedingten unwiederbringlichen Materialabtrag zurückzuführen ist. Im Vergleich zur Hartschlifftechnik, bei der die hergestellten Schliffpräparate über lange Zeit aufbewahrt und für erneute Untersuchungen herangezogen werden können, ist dies bei der Kryoschnitt- sowie Kryoschlifftechnik nicht möglich. Eine spätere Evaluation der Ergebnisse ist daher im Wesentlichen von der Qualität der fotografischen Dokumentation der Schnitt- bzw. Schliffpräparate (-ebenen) abhängig [134].

Die kombinierte Anwendung des „Tissue Printing“-Verfahrens bietet jedoch die Möglichkeit, Gewebestrukturen von Kryoschnitt- bzw. -schliffpräparaten in Form von transferierten Makromolekülen auf Printmembranen zu bewahren und sie somit für spätere histologische Untersuchungen verfügbar zu machen.

Um eine detaillierte histologische Beurteilung der Felsenbeinpräparate gewährleisten zu können, ist eine differenzierte Färbung cochleärer Strukturen notwendig.

Damit diese Strukturen für histologische Farbreagenzien zugänglich sind, ist bei der Verwendung von in Kunststoff eingebetteten Präparaten ein Entfernen des Einbettmediums in Abhängigkeit von seiner Zusammensetzung zwingend oder nur bedingt erforderlich. Dieser Prozess wird Entplasten genannt. Eine kleine Anzahl an mono- bzw. dichromatischen Färbungen kann auch an nicht entplasteten Schnitten durchgeführt werden. Um dabei ein ausreichendes Eindringen des Farbstoffes in das Präparat und somit aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, müssen die Färbezeiten meist erhöht werden [113]. Bei der Evaluation von in Kunststoff eingebetteten Felsenbeinpräparaten mit in-situ liegender Elektrode wurden die Schliffpräparate beispielsweise mit Giemsa-Lösung [124, 125], Toluidinblau [108], Azur II und Pararosanilin [128] oder Silbernitrat und Alizarinviolett [135] gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Somit konnten eine gute Differenzierung knöcherner und membranöser cochleärer Strukturen gewährleistet und deren Integrität beurteilt werden.

Bei der Anwendung immunhistochemischer Nachweismethoden müssen die in Kunststoff eingebetteten Schliffpräparate jedoch aufwendig entplastet werden. Des Weiteren ist in Epoxydharz eingebettetes Gewebe wegen seiner hohen Eigenfluoreszenz nicht für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen geeignet [113].

In der Arbeit von *Herrmann* [111] sollten cochleäre Membranstrukturen direkt in Schliffebenen von kontinuierlich gekühlten Kryofelsenbeinpräparaten nachgewiesen werden. Dies konnte mit einer modifizierten Hämalaun-Eosin-Färbung realisiert werden. Eine Anfärbung mittels immunhistochemischer Methoden konnte aufgrund hierfür nötiger langer Inkubationszeiten über dem Gefrierbereich jedoch nicht durchgeführt werden, da somit eine kontinuierliche Kryofixierung nicht mehr gewährleistet gewesen wäre.

Die Anwendung des „Tissue Printing“-Verfahrens ermöglicht durch den Transfer der Proteine auf eine Printmembran hingegen den Einsatz immunhistochemischer Nachweismethoden. Mittels der Methode der indirekten Immunfluoreszenz können anhand des Nachweises von Connexin 26 und Kollagen Typ IV cochleäre Strukturen dargestellt und bezüglich ihrer Integrität beurteilt werden.

## 5.2 Weiterführende Untersuchungen

Der immunhistochemische Nachweis auf „Tissue Prints“ kryofixierter und -geschliffener Felsenbeinpräparate ermöglicht die spezifische Beurteilung der cochleären Feinstruktur, welche für die Evaluation der Elektrodeninsertion entscheidend ist.

Um die Qualität der endostealen Elektrodeninsertion beurteilen zu können, sind in Zukunft Versuche zu empfehlen, in denen eine endosteale CI-Implantation mit chirurgischen Standardmethoden in post-mortem Felsenbeinpräparate erfolgt. Diese Felsenbeine mit in-situ liegender Elektrode sollten anschließend mit dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Verfahren systematisch aufgearbeitet werden. Mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises von Connexin 26 und Kollagen Typ IV (Abbildung 24) sind insbesondere Strukturen der lateralen cochleären Wand, deren Integrität für eine erfolgreiche endosteale Elektrodeninsertion entscheidend ist, darstellbar.

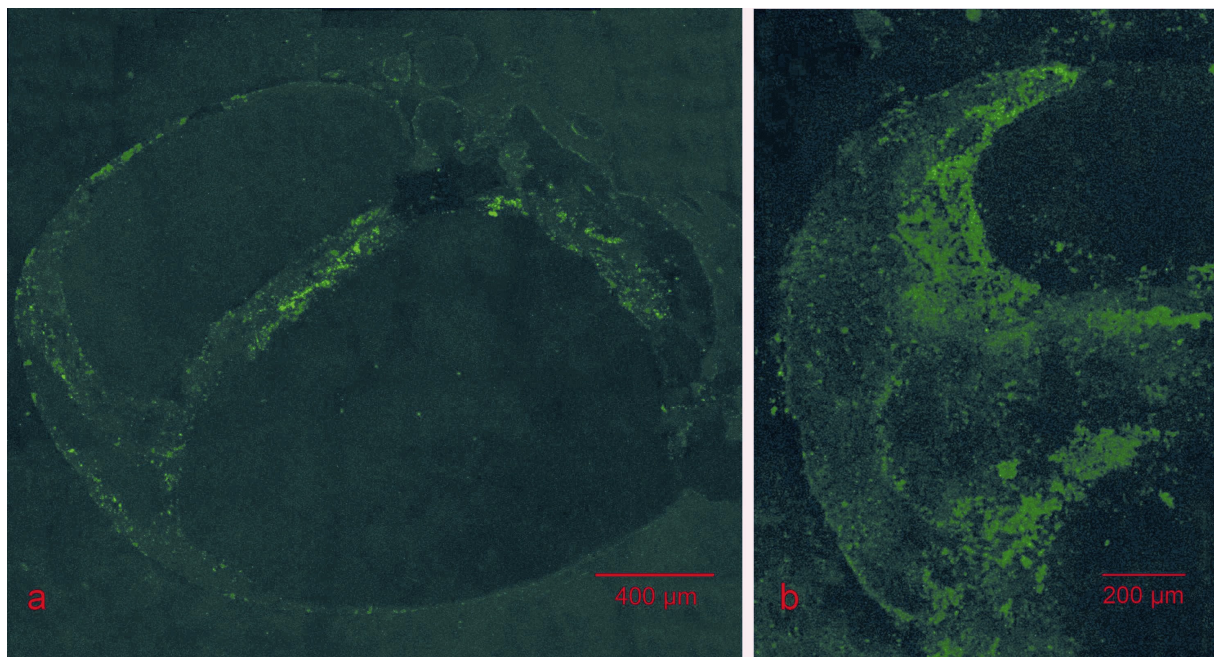


Abbildung 24: Humanes Felsenbeinpräparat B, Immunfluoreszenzfärbung von Kollagen Typ IV, fluoreszenzmikroskopische CLSM-Aufnahme: **a)** „Tissue Print“ Nr. 72, Übersichtsdarstellung der linken basalen cochleären Windung; **b)** „Tissue Print“ Nr. 38, endosteale Region im Bereich des Ligamentum spirale der linken basalen cochleären Windung

Die Methode des „Tissue Printings“ kryofixierter und -geschliffener Felsenbeinpräparate sollte in folgenden Untersuchungen weiter optimiert werden. Im Rahmen der hier beschriebenen Vorversuche ist anhand des Beispiels von Kollagen Typ IV gezeigt worden, dass eine Mindestkonzentration von Proteinen auf die Printmembran übertragen werden muss, um eine fluoreszenzmikroskopische Detektierung zu ermöglichen. Damit auch geringere Konzentrationen nachweisbar sind, muss die Sensitivität der Methode gesteigert werden. Dies ließe sich beispielsweise durch einen zusätzlichen immunhistochemischen Amplifikationsschritt bei der Anwendung der doppelten indirekten Methode mit einem Tertiär-AK realisieren.

Durch eine Steigerung der Sensitivität könnten mittels „Tissue Printings“ auch weitere antigene Strukturen in Cochleae kryofixierter und -geschliffener Felsenbeinpräparate zur Darstellung gebracht werden. Beispielsweise können mit Hilfe von Antikörpern gegen Peripherin oder  $\beta$ III-Tubulin neuronale Strukturen [200] oder mit Hilfe von Antikörpern gegen Prestin äußere Haarzellen [201, 202] spezifisch nachgewiesen werden. Alternativ können äußere und innere Haarzellen sowie cochleäre Stützzellen gemeinsam durch den Nachweis von F-Aktin dargestellt werden [203, 204].



## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die Eignung immunhistochemisch gefärbter „Tissue Prints“ von kryofixierten und -geschliffenen nativen humanen Felsenbeinpräparaten zur Beurteilung der cochleären Feinstruktur nachgewiesen werden.

Ziel der Methodenentwicklung war die Optimierung der Evaluation der Insertion endostealer CI-Elektroden. Hierbei wird die Elektrode zwischen dem häutigen und knöchernen Labyrinth lateral des Lig. spirale positioniert, so dass die für eine erfolgreiche Hörwahrnehmung relevanten cochleären Strukturen (z.B. Basilarmembran, Lamina spiralis ossea und Corti-Organ) bei der Implantation geschont und das Restgehör erhalten werden können. Entscheidend für den Erfolg der endostealen Elektrodeninsertion ist die Vermeidung der Eröffnung der flüssigkeitsgefüllten Räume des Innenohres. Die Wahrung der cochleären Membranintegrität ist somit ein wichtiges Gütekriterium endostealer CI-Elektroden, welches vor der klinischen Anwendung überprüft werden muss. Mit Hilfe der Insertion von Elektrodenprototypen in humane Felsenbeinpräparate konnte die prinzipielle Machbarkeit der endostealen Elektrodeninsertion nachgewiesen werden. Hierfür wurde neben der Anwendung standardisierter Methoden zur Präparateinbettung in Kunststoff auch eine schonende Kryoschliffpräparationsmethode für native Felsenbeinpräparate entwickelt, die eine deutlich artefaktärmere histologische Untersuchung ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Gefrierschlifftechnik optimiert und das Verfahren des „Tissue Printings“ an die Bedingungen einer kontinuierlichen Kryofixierung angepasst. Beim „Tissue Printing“ werden Gewebeabdrücke auf Printmembranen erzeugt. Dabei können zum einen das durch die Druckeinwirkung erzeugte dreidimensionale Geweberelief (physikalischer Print) mikroskopisch beurteilt und zum anderen die durch den Oberflächenkontakt transferierten Proteine auf der Printmembran immunhistologisch gefärbt werden (chemischer Print).

Es wurden zwei native humane Felsenbeinpräparate verwendet, von denen initial mit einem Mikro-CT virtuelle Schnittbilder erzeugt und ein dreidimensionales Modell digital errechnet wurde. Anschließend wurden die Präparate, bei denen sich in einem eine inserierte Simulations-Elektrode befand, kryofixiert und -geschliffen. Dank der Verwendung von  $\text{CO}_2 \text{ solid}$  als Kühlmittel konnte eine kontinuierliche Kühlung der in die Kryoschleifvorrichtung eingepassten Felsenbeinpräparate gewährleistet werden. Im Rahmen dieser Versuche wurde eine optimierte Kryoschleifvorrichtung entwickelt, mit deren Hilfe die Isolierung des Kühlmittels verbessert und der Präparatvorschub erleichtert wurde. Die Kryoschliff-

präparation wurde in Abständen von 50 µm mit SiC-Nassschleifpapieren durchgeführt. Von jeder Kryoschliffebene wurden „Tissue Prints“ auf Optitran™-verstärkten Nitrocellulosemembranen angefertigt. Die physikalischen Prints wurden stereomikroskopisch untersucht und mittels digitaler Fotografie dokumentiert.

Damit ein Proteintransfer auf die Printmembran erfolgen konnte (chemischer Print), musste die Temperatur im Bereich der Kryopräparatschliffebene über den Gefrierpunkt angehoben werden, ohne dabei die kontinuierliche Kryofixierung des restlichen Präparates zu gefährden. Des Weiteren musste zur Erhöhung der transferierten Proteinmenge die Anpresszeit maximiert werden. Hierfür wurde in umfangreichen Versuchsreihen die Schliffebene des Kryofelsenbeinpräparates vor der Durchführung des „Tissue Printings“ für 2 s mit 70%igem Ethanol gespült bzw. mit 30%iger sowie 40%iger Glycerollösung benetzt. Die Printmembranen wurden anschließend immunhistochemisch gefärbt. Dabei wurden zur Beurteilung der Integrität cochleärer Strukturen die Proteine Kollagen Typ IV und Connexin 26 unter Zuhilfenahme der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie mittels indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Die Kryoschliffpräparation stellt eine schnelle und einfache Methode zur histologischen Untersuchung nativer humaner Felsenbeinpräparate dar. Durch die Kryofixierung konnten die besonders empfindlichen cochleären Strukturen derart stabilisiert werden, dass zum einen im Rahmen der Kryoschliffpräparation keine Dislokation von Gewebestrukturen erfolgte und zum anderen durch die Druckeinwirkung beim „Tissue Printing“ ein stereomikroskopisch nachweisbares dreidimensionales Relief der Präparatschliffebene in der Printmembran erzeugt wurde. Neben den cochleären Membranstrukturen konnte eine inserierte Simulations-Elektrode durch die Kryofixierung ebenfalls stabilisiert und somit vor einer Dislokation geschützt werden. Zur Maximierung der Anpresszeit und Optimierung des Proteintransfers erwies sich die Benetzung der Kryopräparatschliffebene mit Glycerollösung als geeignet. Mit der Ethanolspülung wurden hingegen nur kürzere Anpresszeiten erreicht und „Tissue Prints“ schlechterer Qualität hergestellt. Zur Beurteilung der Qualität wurden die physikalischen Prints anhand des Ausmaßes der Schäden der Printmembran in fünf Grade klassifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass bei Anpresszeiten von 30 - 40 s „Tissue Prints“ in sehr guter bis guter Qualität angefertigt werden konnten, welche für eine anschließende Immunfluoreszenzfärbung geeignet waren. Kollagen Typ IV konnte dabei im Bereich epithelialer und vaskulärer Basalmembranen und Connexin 26 im Bereich der cochleären Gap junctions nachgewiesen werden. Der immunhistochemische Nachweis ermöglichte somit die spezifische Beurteilung von Membranstrukturen (Kollagen Typ IV) und Strukturen der lateralen cochleären Wand (Connexin 26), deren Integrität für eine erfolgreiche endosteale Elektrodeninsertion entscheidend ist.

---

Das „Tissue Printing“ kryofixierter und -geschliffener Präparate stellt eine geeignete histologische Untersuchungsmethode nicht nur für cochleäre, sondern auch für viele andere empfindliche Gewebe dar, für deren Beurteilung ein natives Belassen entscheidend ist. Durch die Vielzahl der zur Verfügung stehenden Antikörpersysteme können dank der immunhistochemischen Färbung der „Tissue Prints“ verschiedene Proteine spezifisch detektiert und somit unterschiedlichste Fragestellungen untersucht werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] E. Kammerer, *Kinderpsychiatrische Aspekte der schweren Hörschädigung*, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1988.
- [2] R. Probst, G. Grevers und H. Iro, *Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde*, Stuttgart: Thieme, 2008.
- [3] *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 260. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter, 2004.
- [4] A.L. Schumacher und G.J. Ledderose, *Facts HNO*, Marburg: KVM, 2010.
- [5] „NIH consensus conference. Cochlear implants in adults and children“, *The Journal of the American Medical Association*, vol. 274 (24), 1995, S. 1955-1961.
- [6] E. Wever und C. Bray, „Action currents in the auditory nerve in response to acoustical stimulation“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 16 (5), 1930, S. 344-350.
- [7] F. Zöllner und W.D. Keidel, „Gehörvermittlung durch elektrische Erregung des Nervus acusticus“, *Archiv für Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilkunde, vereinigt mit Zeitschrift für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde*, vol. 181, 1963, S. 216-223.
- [8] K. Jaekel, B. Richter und R. Laszig, „The history of cochlear implantation: From volta to multichannel-intracochlear stimulation“, *Laryngo-Rhino-Otologie*, vol. 81 (9), 2002, S. 649-658.
- [9] W.F. House und J. Urban, „Long term results of electrode implantation and electronic stimulation of the cochlea in man“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 82 (4), 1973, S. 504-517.
- [10] J.H. Doyle, J.B. Doyle und F.M. Turnbull, „Electrical stimulation of eighth cranial nerve“, *Archives of Otolaryngology*, vol. 80, 1964, S. 388-391.
- [11] W.F. House, „Cochlear implants“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 85 suppl. 27 (3Pt2), 1976, S. 1-93.
- [12] M.M. Merzenich, D.N. Schindler und M.W. White, „Feasibility of multichannel scala tympani stimulation“, *The Laryngoscope*, vol. 84 (11), 1974, S. 1887-1893.
- [13] G.M. Clark, *Cochlear implants: fundamentals and applications*, New York: Springer, 2003.
- [14] K. Burian, E. Hochmair, I. Hochmair-Desoyer und M.R. Lessel, „Designing of and experience with multichannel cochlear implants“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 87 (3-4), 1979, S. 190-195.
- [15] P. Banfai, G. Hortmann, S. Kubik und F. Wustrow, „Cochlear implant with multi-electrodes without opening the labyrinthine space“, *Laryngologie, Rhinologie, Otologie*, vol. 58 (6), 1979, S. 526-534.

- [16] P. Banfai, S. Kubik und G. Hortmann, „Our extra-scalar operating method of cochlear implantation. Experience with 46 cases“, *Acta Oto-Laryngologica. Suppl.*, vol. 411, 1984, S. 9-12.
- [17] G.M. Clark, R.K. Shepherd, J.F. Patrick, R.C. Black und Y.C. Tong, „Design and fabrication of the banded electrode array“, *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 405, 1983, S. 191-201.
- [18] N. Marangos und R. Laszig, „Cochlear Implants: Die prothetische Versorgung bei Taubheit um die Jahrtausendwende“, *HNO*, vol. 46 (1), 1998, S. 12-28.
- [19] B.S. Wilson, C.C. Finley, D.T. Lawson, R.D. Wolford, D.K. Eddington und W.M. Rabinowitz, „Better speech recognition with cochlear implants“, *Nature*, vol. 352 (6332), 1991, S. 236-238.
- [20] E. Lehnhardt, „Intrakochleäre Platzierung der Cochlear-Implant-Elektroden in soft surgery technique“, *HNO*, vol. 41 (7), 1993, S. 356-359.
- [21] T. Klenzner, M. Stecker, N. Marangos und R. Laszig, „Zur Indikationserweiterung des Cochlear-Implant“, *HNO*, vol. 47 (2), 1999, S. 95-100.
- [22] B.J. Gantz und C.W. Turner, „Combining acoustic and electrical hearing“, *The Laryngoscope*, vol. 113 (10), 2003, S. 1726-1730.
- [23] O.F. Adunka, J. Kiefer, M.H. Unkelbach, T. Lehnert und W. Gstoettner, „Development and evaluation of an improved cochlear implant electrode design for electric acoustic stimulation“, *The Laryngoscope*, vol. 114 (7), 2004, S. 1237-1241.
- [24] R. Laszig, A. Aschendorff, J. Schipper und T. Klenzner, „Aktuelle Entwicklung zum Kochleaimplant“, *HNO*, vol. 52 (4), 2004, S. 357-362.
- [25] O.F. Adunka, J. Kiefer, M.H. Unkelbach, A. Radeloff, T. Lehnert und W. Gstöttner, „Evaluation eines Elektrodendesigns für die kombinierte elektrisch-akustische Stimulation“, *Laryngo-Rhino-Otologie*, vol. 83 (10), 2004, S. 653-658.
- [26] W. Gstöttner, S.-M. Pok, S. Peters, J. Kiefer und O.F. Adunka, „Kochleaimplantat mit Tieftonrestgehörerhalt“, *HNO*, vol. 53 (9), 2005, S. 784-791.
- [27] A. Herrmann, H.W. Pau, D. Behrend, W. Schmidt und K.P. Schmitz, „The freeze grinding technique as a novel preparative method for human temporal bone“, *Biomaterialien*, vol. 1, 2005, S. 76-77.
- [28] H.W. Pau, A. Herrmann, W. Schmidt und D. Behrend, „New possibilities of examining temporal bone specimens using a frozen-grinding technique“, *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering. Suppl.*, vol. 50, 2005, S. 519-520.
- [29] A. Waldeyer, J. Fanghänel und F. Pera, *Anatomie des Menschen*, Berlin: Walter de Gruyter, 2009.
- [30] E.B. Goldstein, *Wahrnehmungspsychologie. Eine Einführung*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1997.
- [31] H.-P. Zenner, *Hören - Physiologie, Biochemie, Zell- und Neurobiologie*, Stuttgart: Thieme, 1994.
- [32] L.C. Junqueira und J. Carneiro, *Histologie*, 4. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer, 1996.

- 
- [33] V. Palys, „Viktors`s notes for the neurosurgery resident“, online verfügbar: <http://www.neurosurgeryresident.net>, letzter Zugriff am 18. Feb. 2011.
- [34] S.M. Echter, R.R. Fay und A.N. Popper, „Structure of the Mammalian Cochlea“, *Comparitive Hearing: Mammals*, vol. 4, Springer, 1994, S. 134-171.
- [35] Y. Raphael und R.A. Altschuler, „Structure and innervation of the cochlea“, *Brain Research Bulletin*, vol. 60 (5-6), 2003, S. 397-422.
- [36] U. Welsch und T. Deller, *Sobotta Lehrbuch Histologie*, 3. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer, 2010.
- [37] H. Yamashita, D. Bagger-Sjöbäck und J. Wersäll, „The presence of laminin in the fetal human inner ear“, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 248 (8), 1991, S. 479-482.
- [38] M. Takahashi und K. Hokunan, „Localization of type IV collagen and laminin in the guinea pig inner ear“, *The Annals of Otology, Rhinology & Laryngology. Suppl.*, vol. 157, 1992, S. 58-62.
- [39] H. Satoh, K. Kawasaki, I. Kihara und Y. Nakano, „Importance of type IV collagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan in the regulation of labyrinthine fluid in the rat cochlear duct“, *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 255 (6), 1998, S. 285-288.
- [40] M.M. Kleppel, P.A. Santi, J.D. Cameron, J. Wieslander und A.F. Michael, „Human tissue distribution of novel basement membrane collagen“, *The American Journal of Pathology*, vol. 134 (4), 1989, S. 813-825.
- [41] D.F. Barker, S.L. Hostikka, J. Zhou, L.T. Chow, A.R. Oliphant, S.C. Gerken, M.C. Gregory, M.H. Skolnick, C.L. Atkin und K. Tryggvason, „Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome“, *Science (New York)*, vol. 248 (4960), 1990, S. 1224-1227.
- [42] J.J. Zwislocki, N.B. Slepecky, L.K. Cefaratti und R.L. Smith, „Ionic coupling among cells in the organ of Corti“, *Hearing Research*, vol. 57 (2), 1992, S. 175-194.
- [43] T. Kikuchi, R.S. Kimura, D.L. Paul, T. Takasaka und J.C. Adams, „Gap junction systems in the mammalian cochlea“, *Brain Research. Brain Research Reviews*, vol. 32 (1), 2000, S. 163-166.
- [44] H.-B. Zhao, T. Kikuchi, A. Ngezahayo und T.W. White, „Gap junctions and cochlear homeostasis“, *The Journal of Membrane Biology*, vol. 209 (2-3), 2006, S. 177-186.
- [45] K. Willecke, J. Eiberger, J. Degen, D. Eckardt, A. Romualdi, M. Güldenagel, U. Deutsch und G. Söhl, „Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome“, *Biological Chemistry*, vol. 383 (5), 2002, S. 725-737.
- [46] T. Kikuchi, R.S. Kimura, D.L. Paul und J.C. Adams, „Gap junctions in the rat cochlea: immunohistochemical and ultrastructural analysis“, *Anatomy and Embryology*, vol. 191 (2), 1995, S. 101-118.
- [47] H.-B. Zhao und N. Yu, „Distinct and gradient distributions of Connexin 26 and Connexin 30 in the cochlear sensory epithelium of guinea pigs“, *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 499 (3), 2006, S. 506-518.

- [48] D.P. Kelsell, J. Dunlop, H.P. Stevens, N.J. Lench, J.N. Liang, G. Parry, R.F. Mueller und I.M. Leigh, „Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness“, *Nature*, vol. 387 (6628), 1997, S. 80-83.
- [49] A. Grifa, C.A. Wagner, L. D'Ambrosio, S. Melchionda, F. Bernardi, N. Lopez-Bigas, R. Rabionet, M. Arbones, M.D. Monica, X. Estivill, L. Zelante, F. Lang und P. Gasparini, „Mutations in GJB6 cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus“, *Nature Genetics*, vol. 23 (1), 1999, S. 16-18.
- [50] Q. Chang, W. Tang, S. Ahmad, B. Stong, G. Leu und X. Lin, „Functional studies reveal new mechanisms for deafness caused by connexin mutations“, *Otology & Neurotology*, vol. 30 (2), 2009, S. 237-240.
- [51] H.-B. Zhao, „Connexin 26 is responsible for anionic molecule permeability in the cochlea for intercellular signalling and metabolic communications“, *The European Journal of Neuroscience*, vol. 21 (7), 2005, S. 1859-1868.
- [52] H.-B. Zhao, N. Yu und C.R. Fleming, „Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102 (51), 2005, S. 18724-18729.
- [53] A. Forge, D. Becker, S. Casalotti, J. Edwards, W.H. Evans, N. Lench und M. Souter, „Gap junctions and connexin expression in the inner ear“, *Novartis Foundation Symposium*, vol. 219, 1999, S. 134-156.
- [54] Y.-P. Liu und H.-B. Zhao, „Cellular characterization of Connexin 26 and Connexin 30 expression in the cochlear lateral wall“, *Cell and Tissue Research*, vol. 333 (3), 2008, S. 395-403.
- [55] R. Klinke und S. Silbernagl, *Lehrbuch der Physiologie*, 4. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2003.
- [56] H. von Helmholtz, *Die Mechanik der Gehörknöchelchen und des Trommelfells*, Pflüger's Archiv für Physiologie, 1868.
- [57] J.O. Pickles, *An Introduction to the Physiology of Hearing*, 3. Aufl. Academic Press, 2008.
- [58] P.M. Sellick und I.J. Russell, „The responses of inner hair cells to basilar membrane velocity during low frequency auditory stimulation in the guinea pig cochlea“, *Hearing Research*, vol. 2 (3-4), 1980, S. 439-445.
- [59] B. Delgutte und N.Y. Kiang, „Speech coding in the auditory nerve: IV. Sounds with consonant-like dynamic characteristics“, *The Journal of the Acoustical Society of America*, vol. 75 (3), 1984, S. 897-907.
- [60] R. Klinke, „Die Verarbeitung von Schallreizen im Innenohr“, *HNO*, vol. 35 (4), 1987, S. 139-148.
- [61] H. Spoendlin, „Anatomisch-pathologische Aspekte der Elektrostimulation des ertaubten Innenohrs“, *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 223 (1), 1979, S. 1-75.
- [62] F.E. Musiek und W.W. Lee, „Neuroanatomical correlates to central deafness“, *Scandinavian Audiology. Suppl.*, vol. 49, 1998, S. 18-25.

- [63] J.B. Nadol und D.K. Eddington, „Histopathology of the inner ear relevant to cochlear implantation“, *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 64, 2006, S. 31-49.
- [64] H.F. Schuknecht, „Auditory and cytochlear correlates of inner ear disorders“, *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, vol. 110 (6), 1994, S. 530-538.
- [65] S.S. Spicer und B.A. Schulte, „Spiral ligament pathology in quiet-aged gerbils“, *Hearing Research*, vol. 172 (1-2), 2002, S. 172-185.
- [66] A.A. Spector, A.S. Popel, R.A. Eatock und W.E. Brownell, „Mechanosensitive channels in the lateral wall can enhance the cochlear outer hair cell frequency response“, *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 33 (8), 2005, S. 991-1002.
- [67] C.W. Turner, „Hearing loss and the limits of amplification“, *Audiology & Neuro-Otology*, vol. 11 suppl. 1, 2006, S. 2-5.
- [68] M.C. Liberman und L.W. Dodds, „Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. III. Stereocilia damage and alterations of threshold tuning curves“, *Hearing Research*, vol. 16 (1), 1984, S. 55-74.
- [69] A.A. Eshraghi, „Prevention of cochlear implant electrode damage“, *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, vol. 14 (5), 2006, S. 323-328.
- [70] J.B. Nadol, Y.S. Young und R.J. Glynn, „Survival of spiral ganglion cells in profound sensorineural hearing loss: implications for cochlear implantation“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 98 (6), 1989, S. 411-416.
- [71] C.E. Zimmermann, B.J. Burgess und J.B. Nadol, „Patterns of degeneration in the human cochlear nerve“, *Hearing Research*, vol. 90 (1-2), 1995, S. 192-201.
- [72] A.A. Eshraghi, V. Hodges, F.F. Telischi und T.J. Balkany, „Cochlear implant technology“, *Textbook of neurotology*, Philadelphia: Elsevier, 2005, S. 130-1314.
- [73] C. von Ilberg, J. Kiefer, J. Tillein, T. Pfenningdorff, R. Hartmann, E. Stürzebecher und R. Klinke, „Electric-acoustic stimulation of the auditory system. New technology for severe hearing loss“, *ORL - Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties*, vol. 61 (6), 1999, S. 334-340.
- [74] E. Lehnhardt, H. Wagner und Z. Kabelka, „Are we confident about operating on - or even inside - an inner ear that is still functional without having to fear that the patient will lose his residual hearing?“, *Otolaryngologia Polska. The Polish Otolaryngology*, vol. 58 (1), 2004, S. 45-49.
- [75] J. Kiefer, W. Gstoettner, W. Baumgartner, S.M. Pok, J. Tillein, Q. Ye und C. von Ilberg, „Conservation of low-frequency hearing in cochlear implantation“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 124 (3), 2004, S. 272-280.
- [76] W. Gstoettner, J. Kiefer, W.D. Baumgartner, S. Pok, S. Peters und O.F. Adunka, „Hearing preservation in cochlear implantation for electric acoustic stimulation“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 124 (4), 2004, S. 348-352.
- [77] A. Djournio und C. Eyries, „Prothèse auditive par excitation électrique à distance du nerf sensoriel à l'aide d'un bobinage inclus à demeure“, *La Presse Médicale*, vol. 65 (63), 1957, S. 1417.



- 
- [78] A. Ernst, R.-D. Battmer und I. Todt, *Cochlear Implant heute*, Heidelberg: Springer, 2009.
- [79] G.M. Clark, Y.C. Tong und J.F. Patrick, *Cochlear prostheses*, Edinburgh, New York: Churchill Livingstone, 1990.
- [80] Cochlear<sup>TM</sup>, „Wenn Hörgeräte nicht mehr ausreichen - Der Weg zum Cochlear Implantat“, Cochlear GmbH Hannover, FEN00547 ISS6 APR 08.
- [81] G.M. Clark, B.C. Pyman und Q.R. Bailey, „The surgery for multiple-electrode cochlear implantations“, *The Journal of Laryngology and Otology*, vol. 93 (3), 1979, S. 215-223.
- [82] R.J.S. Briggs, M. Tykocinski, E. Saunders, W. Hellier, M. Dahm, B. Pyman und G. Clark, „Surgical implications of perimodiolar cochlear implant electrode design: avoiding intracochlear damage and scala vestibuli insertion“, *Cochlear Implants International*, vol. 2 (2), 2001, S. 135-149.
- [83] R.J.S. Briggs, M. Tykocinski, K. Stidham und J.B. Roberson, „Cochleostomy site: implications for electrode placement and hearing preservation“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 125 (8), 2005, S. 870-876.
- [84] R.J.S. Briggs, M. Tykocinski, J. Xu, F. Risi, M. Svehla, R. Cowan, T. Stover, P. Erfurt und T. Lenarz, „Comparison of round window and cochleostomy approaches with a prototype hearing preservation electrode“, *Audiology & Neuro-Otology*, vol. 11 suppl. 1, 2006, S. 42-48.
- [85] O.F. Adunka, M.H. Unkelbach, M. Mack, M. Hambek, W. Gstoettner und J. Kiefer, „Cochlear implantation via the round window membrane minimizes trauma to cochlear structures: a histologically controlled insertion study“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 124 (7), 2004, S. 807-812.
- [86] T. Lenarz, T. Stover, A. Buechner, G. Paasche, R. Briggs, F. Risi, J. Pesch und R.-D. Battmer, „Temporal bone results and hearing preservation with a new straight electrode“, *Audiology & Neuro-Otology*, vol. 11 suppl. 1, 2006, S. 34-41.
- [87] D. Friedland und C. Runge-Samuelson, „Soft cochlear implantation: rationale for the surgical approach“, *Trends in Amplification*, vol. 13 (2), 2009, S. 124-138.
- [88] J.B. Nadol, J.Y. Shiao, B.J. Burgess, D.R. Ketten, D.K. Eddington, B.J. Gantz, I. Kos, P. Montandon, N.J. Coker, J.T. Roland und J.K. Shallop, „Histopathology of cochlear implants in humans“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 110 (9), 2001, S. 883-891.
- [89] P.S. Roland und C.G. Wright, „Surgical aspects of cochlear implantation: mechanisms of insertional trauma“, *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 64, 2006, S. 11-30.
- [90] M. Seki, H. Miyasaka, H. Edamatsu und K. Watanabe, „Changes in permeability of stria vessels following vibration given to auditory ossicle by drill“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 110 (2), 2001, S. 122-126.
- [91] H.W. Pau, T. Just, M. Bornitz, N. Lasurashvili und T. Zahnert, „Noise exposure of the inner ear during drilling a cochleostomy for cochlear implantation“, *The Laryngoscope*, vol. 117 (3), 2007, S. 535-540.

- [92] A.J. Duvall und V.T. Rhodes, „Ultrastructure of the organ of Corti following intermixing of cochlear fluids“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 76 (3), 1967, S. 688-708.
- [93] L.C. Shaddock, C.G. Wright und R.P. Hamernik, „A morphometric study of microvascular pathology following experimental rupture of Reissner’s membrane“, *Hearing Research*, vol. 20 (2), 1985, S. 119-129.
- [94] A. Aschendorff, J. Kromeier, T. Klenzner und R. Laszig, „Quality control after insertion of the nucleus contour and contour advance electrode in adults“, *Ear and Hearing*, vol. 28 (2), 2007, S. 75S-79S.
- [95] M. Hara, Y. Nomura und K. Saito, „Histopathologic study of the perilymph-suctioned labyrinth“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 99 (4Pt1), 1990, S. 316-320.
- [96] M.A. Marsh, H.A. Jenkins und N.J. Coker, „Histopathology of the temporal bone following multichannel cochlear implantation“, *Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, vol. 118 (11), 1992, S. 1257-1265.
- [97] F.J. Cervera-Paz und F.H. Linthicum, „Cochlear wall erosion after cochlear implantation“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 114 (7), 2005, S. 543-546.
- [98] A. Radeloff, M.H. Unkelbach, J. Tillein, S. Braun, S. Helbig, W. Gstöttner und O.F. Adunka, „Impact of intrascalar blood on hearing“, *The Laryngoscope*, vol. 117 (1), 2007, S. 58-62.
- [99] G.M. Clark, „An evaluation of per-scalar cochlear electrode implantation techniques. An histopathological study in cats“, *The Journal of Laryngology and Otology*, vol. 91 (3), 1977, S. 85-99.
- [100] G.M. Clark, R.K. Shepherd, B.K. Franz, R.C. Dowell, Y.C. Tong, P.J. Blamey, R.L. Webb, B.C. Pyman, J. McNaughtan und D.M. Bloom, „The histopathology of the human temporal bone and auditory central nervous system following cochlear implantation in a patient. Correlation with psychophysics and speech perception results“, *Acta Oto-Laryngologica. Suppl.*, vol. 448, 1988, S. 1-65.
- [101] J. Fayad, F.H. Linthicum, S.R. Otto, F.R. Galey und W.F. House, „Cochlear implants: histopathologic findings related to performance in 16 human temporal bones“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 100 (10), 1991, S. 807-811.
- [102] N.L. Cohen, J.T. Roland und A. Fishman, „Surgical technique for the Nucleus Contour cochlear implant“, *Ear and Hearing*, vol. 23 (1), 2002, S. 59S-66S.
- [103] W.K. Gstöttner, O. Adunka, P. Franz, J. Hamzavi, H. Plenck, M. Susani, W. Baumgartner und J. Kiefer, „Perimodiolar electrodes in cochlear implant surgery“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 121 (2), 2001, S. 216-219.
- [104] B. Richter, K. Jaekel, A. Aschendorff, N. Marangos und R. Laszig, „Cochlear structures after implantation of a perimodiolar electrode array“, *The Laryngoscope*, vol. 111 (5), 2001, S. 837-843.

- [105] M. Tykocinski, L.T. Cohen, B.C. Pyman, T. Roland, C. Treaba, J. Palamara, M.C. Dahm, R.K. Shepherd, J. Xu, R.S. Cowan, N.L. Cohen und G.M. Clark, „Comparison of electrode position in the human cochlea using various perimodiolar electrode arrays“, *The American Journal of Otology*, vol. 21 (2), 2000, S. 205-211.
- [106] T. Klenzner, B. Richter, H. Nagursky, J. Schipper, R. Laszig und A. Aschendorff, „Evaluation of the insertion-trauma of the Nucleus Contour Advance electrode-array in a human temporal bone model“, *Laryngo-Rhino-Otologie*, vol. 83 (12), 2004, S. 840-844.
- [107] H.W. Pau, T. Just, E. Lehnhardt, H. Hessel und D. Behrend, „An ‚endosteal electrode‘ for cochlear implantation in cases with residual hearing? Feasibility study: preliminary temporal bone experiments“, *Otology & Neurotology*, vol. 26 (3), 2005, S. 448-454.
- [108] H.W. Pau, T. Just, S. Dommerich, E. Lehnhardt und D. Behrend, „Concept and anatomical feasibility study of an ‚endosteal electrode‘ for bimodal stimulation in severely deaf ears“, *Laryngo-Rhino-Otologie*, vol. 84 (6), 2005, S. 402-407.
- [109] H.W. Pau, T. Just, S. Dommerich und D. Behrend, „Temporal bone investigations on landmarks for conventional or endosteal insertion of cochlear electrodes“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 127 (9), 2007, S. 920-926.
- [110] H.W. Pau, A. Herrmann, S. Mühlberg, W. Schmidt und D. Behrend, „Entwicklung einer Kryoschlifftechnik für Felsenbeinpräparate: eine neue Möglichkeit zur Beurteilung ex vivo implantierter CI-Test-Elektroden“, *Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering*, vol. 55 (4), 2010, S. 237-243.
- [111] A. Herrmann, „Machbarkeitsstudie einer Gefrierschliffmethode am Beispiel humaner und oviner Felsenbeinpräparate“, Rostock, 2008.
- [112] B. Romeis und P. Böck, *Mikroskopische Technik*, 17. Aufl. München: Urban & Fischer, 2001.
- [113] G. Lang, *Histotechnik*, Wien: Springer, 2006.
- [114] H. Sitte, „Advanced instrumentation and methodology related to cryoultramicrotomy: a review“, *Scanning Microscopy. Suppl.*, vol. 10, 1996, S. 387-466.
- [115] G.F.V. Voort, *Buehler SumMet - The science behind materials preparation*, 2004.
- [116] W. Burkart, *Handbuch für das Schleifen und Polieren*, 6. Aufl. Saulgau: Leuze, 1991.
- [117] R. Souffrant, D. Behrend, H.W. Pau, E. Lehnhardt und K.-P. Schmitz, „Innenohr schonende Cochlea-Implantat Elektrode, Anatomisch-histologische Studie am humanen Felsenbein“, *Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering*, vol. 48 (1), 2003, S. 48-49.
- [118] L. Bjerregaard, K. Geels, B. Ottesen und M. Rückert, *Metalog Guide*, Struers A/S, 2002.
- [119] R.K. Shepherd, G.M. Clark, B.C. Pyman und R.L. Webb, „Banded intracochlear electrode array: evaluation of insertion trauma in human temporal bones“, *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 94 (1Pt1), 1985, S. 55-59.
- [120] D.W. Kennedy, „Multichannel intracochlear electrodes: mechanism of insertion trauma“, *The Laryngoscope*, vol. 97 (1), 1987, S. 42-49.

- [121] M.J. O’Leary, J. Fayad, W.F. House und F.H. Linthicum, „Electrode insertion trauma in cochlear implantation“, *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology*, vol. 100 (9Pt1), 1991, S. 695-699.
- [122] D.B. Welling, R. Hinojosa, B.J. Gantz und J.T. Lee, „Insertional trauma of multichannel cochlear implants“, *The Laryngoscope*, vol. 103 (9), 1993, S. 995-1001.
- [123] B. Richter, A. Aschendorff, H. Nagursky, J. Schipper, R. Laszig und T. Klenzner, „Methods for evaluation of perimodiolar CI electrode arrays in human temporal bones“, *Laryngo-Rhino-Otologie*, vol. 84 (1), 2005, S. 42-50.
- [124] W. Gstoettner, H. Plenck, P. Franz, J. Hamzavi, W. Baumgartner, C. Czerny und K. Ehrenberger, „Cochlear implant deep electrode insertion: extent of insertional trauma“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 117 (2), 1997, S. 274-277.
- [125] W. Gstoettner, J. Hamzavi, P. Franz, H. Plenck, C. Czerny, M. Susani, O.F. Adunka, und W.D. Baumgartner, „Intracochleäre Position von Cochlear-Implant-Elektroden“, *Wiener Klinische Wochenschrift*, vol. 112 (11), 2000, S. 477-480.
- [126] H. Plenck, „The microscopic evaluation of hard tissue implants“, *Techniques of Biocompatibility Testing*, vol. 1, CRC-Press, 1986, S. 35-81.
- [127] E. Lehnhardt, „Intracochlear electrode placement facilitated by Healon“, *Advances in Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 48, 1993, S. 62-64.
- [128] B. Richter, A. Aschendorff, P. Lohnstein, H. Husstedt, H. Nagursky und R. Laszig, „The Nucleus Contour electrode array: A radiological and histological study“, *Laryngoscope*, vol. 111 (3), 2001, S. 508-514.
- [129] L.T. Cohen, J. Xu, S.A. Xu und G.M. Clark, „Improved and simplified methods for specifying positions of the electrode bands of a cochlear implant array“, *The American Journal of Otolaryngology*, vol. 17 (6), 1996, S. 859-865.
- [130] J. Xu, S.A. Xu, L.T. Cohen und G.M. Clark, „Cochlear view: postoperative radiography for cochlear implantation“, *The American Journal of Otolaryngology*, vol. 21 (1), 2000, S. 49-56.
- [131] H.W. Husstedt, A. Aschendorff, B. Richter, R. Laszig und M. Schumacher, „Nondestructive three-dimensional analysis of electrode to modiolus proximity“, *Otolaryngology & Neurotology*, vol. 23 (1), 2002, S. 49-52.
- [132] A. Aschendorff, R. Kubalek, A. Hochmuth, A. Bink, C. Kurtz, P. Lohnstein, T. Klenzner und R. Laszig, „Imaging procedures in cochlear implant patients - Evaluation of different radiological techniques“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 124, 2004, S. 46-49.
- [133] B. Richter, A. Aschendorff, P. Lohnstein, H. Husstedt, H. Nagursky und R. Laszig, „Clarion 1.2 standard electrode array with partial space-filling positioner: radiological and histological evaluation in human temporal bones“, *The Journal of Laryngology & Otolaryngology*, vol. 116 (7), 2002, S. 507-513.
- [134] A.A. Eshraghi, N.W. Yang und T.J. Balkany, „Comparative study of cochlear damage with three perimodiolar electrode designs“, *The Laryngoscope*, vol. 113 (3), 2003, S. 415-419.

- [135] T. Stöver, P. Issing, G. Graurock, P. Erfurt, Y. ElBeltagy, G. Paasche und T. Lenarz, „Evaluation of the advance off-stylet insertion technique and the cochlear insertion tool in temporal bones“, *Otology & Neurotology*, vol. 26 (6), 2005, S. 1161-1170.
- [136] J.T. Roland, A.J. Fishman, G. Alexiades und N.L. Cohen, „Electrode to modiolus proximity: a fluoroscopic and histologic analysis“, *The American Journal of Otology*, vol. 21 (2), 2000, S. 218-225.
- [137] K.B. Hüttenbrink, T. Zahnert, G. Hofmann, G. Kronholz und C. Jolly, „Visualization of cochlear implant electrode movements in the cochlea by using x-ray microscopy“, *Laryngo-Rhino-Otologie*, vol. 80 (2), 2001, S. 66-70.
- [138] A.J. Fishman, J.T. Roland, G. Alexiades, J. Mierzwinski und N.L. Cohen, „Fluoroscopically assisted cochlear implantation“, *Otology & Neurotology*, vol. 24 (6), 2003, S. 882-886.
- [139] O.F. Adunka, H.C. Pillsbury und J. Kiefer, „Combining perimodiolar electrode placement and atraumatic insertion properties in cochlear implantation - fact or fantasy?“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 126 (5), 2006, S. 475-482.
- [140] M.A. Marsh, J. Xu, P.J. Blamey, L.A. Whitford, S.A. Xu, J.M. Silverman und G.M. Clark, „Radiologic evaluation of multichannel intracochlear implant insertion depth“, *The American Journal of Otology*, vol. 14 (4), 1993, S. 386-391.
- [141] A. Postnov, A. Zarowski, N. De Clerck, F. Vanpoucke, F.E. Offeciers, D. Van Dyck und S. Peeters, „High resolution micro-CT scanning as an innovative tool for evaluation of the surgical positioning of cochlear implant electrodes“, *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 126 (5), 2006, S. 467-474.
- [142] A.A. Eshraghi, J. He, C.H. Mou, M. Polak, A. Zine, C. Bonny, T.J. Balkany und T.R. Van De Water, „D-JNK1-1 treatment prevents the progression of hearing loss in a model of cochlear implantation trauma“, *Otology & Neurotology*, vol. 27 (4), 2006, S. 504-511.
- [143] A.H. Coons, H.J. Creech und R.N. Jones, „Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group“, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 47, 1941, S. 200-202.
- [144] A.H. Coons, H.J. Creech, R.N. Jones und E. Berliner, „The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody“, *Journal of immunological methods*, vol. 45, 1942, S. 159-170.
- [145] J. Fex und R.A. Altschuler, „Immunocytochemistry of the mammalian cochlea: results and expectations“, *Auditory Biochemistry*, Charles C Thomas Pub Ltd, 1985, S. 5-30.
- [146] A. Flock, „Contractile proteins in hair cells“, *Hearing Research*, vol. 2 (3-4), 1980, S. 411-412.
- [147] A. Flock, H.C. Cheung, B. Flock und G. Utter, „Three sets of actin filaments in sensory cells of the inner ear. Identification and functional orientation determined by gel electrophoresis, immunofluorescence and electron microscopy“, *Journal of Neurocytology*, vol. 10 (1), 1981, S. 133-147.
- [148] H.P. Zenner, „Cytoskeletal and muscle-like elements in cochlear hair cells“, *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, vol. 230 (1), 1981, S. 81-92.

- [149] A.H. Coons und M.H. Kaplan, „Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody“, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 91 (1), 1950, S. 1-13.
- [150] A.H. Coons, E.H. Leduc und J.M. Connolly, „Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit“, *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 102 (1), 1955, S. 49-60.
- [151] E.H. Beutner, E.J. Holborow und G.D. Johnson, „A new fluorescent antibody method: mixed antiglobulin immunofluorescence or labelled antigen indirect immunofluorescence staining“, *Nature*, vol. 208 (5008), 1965, S. 353-355.
- [152] S.Y. Mao, L.C. Javois und U.M. Kent, „Overview of antibody use in immunocytochemistry“, *Methods in Molecular Biology*, vol. 115, 1999, S. 3-10.
- [153] P.K. Nakane und G.B. Pierce, „Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens“, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 14 (12), 1966, S. 929-931.
- [154] A.G. Farr und P.K. Nakane, „Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: a brief review“, *Journal of Immunological Methods*, vol. 47 (2), 1981, S. 129-144.
- [155] G.L. Bratthauer, „Overview of antigen detection through enzymatic activity“, *Methods in Molecular Biology*, vol. 115, 1999, S. 181-190.
- [156] L.A. Sternberger, P.H. Hardy, J.J. Cuculis und H.G. Meyer, „The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes“, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 18 (5), 1970, S. 315-333.
- [157] G.L. Bratthauer, „The peroxidase-antiperoxidase (PAP) method and other all-immunologic detection methods“, *Methods in Molecular Biology*, vol. 115, 1999, S. 191-201.
- [158] G.L. Bratthauer, „The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods“, *Methods in Molecular Biology*, vol. 115, 1999, S. 203-214.
- [159] S.M. Hsu, L. Raine und H. Fanger, „The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics“, *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 75 (6), 1981, S. 816-821.
- [160] J.L. Guesdon, T. Ternynck und S. Avrameas, „The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques“, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 27 (8), 1979, S. 1131-1139.
- [161] J.E. Varner und Z. Ye, „Tissue printing“, *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 8 (6), 1994, S. 378-384.
- [162] J. Renart, J. Reiser und G.R. Stark, „Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76 (7), 1979, S. 3116-3120.

- [163] H. Towbin, T. Staehelin und J. Gordon, „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 76 (9), 1979, S. 4350-4354.
- [164] M. Okabe, C. Nyakas, B. Buwalda und P.G. Luiten, „In situ blotting: a novel method for direct transfer of native proteins from sectioned tissue to blotting membrane: procedure and some applications“, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 41 (6), 1993, S. 927-934.
- [165] R. Daoust, „Localization of deoxyribonuclease in tissue sections; a new approach to the histochemistry of enzymes“, *Experimental Cell Research*, vol. 12 (2), 1957, S. 203-211.
- [166] R. Daoust, „Histochemical localization of enzyme activities by substrate film methods: ribonucleases, deoxyribonucleases, proteases, amylase, and hyaluronidase“, *International Review of Cytology*, vol. 18, 1965, S. 191-221.
- [167] P. Gaddum und R.J. Blandau, „Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on gelatin membranes“, *Science*, vol. 170 (959), 1970, S. 749-751.
- [168] B. Seshi, „Cell blotting: techniques for staining and microscopical examination of cells blotted on nitrocellulose paper“, *Analytical Biochemistry*, vol. 157 (2), 1986, S. 331-342.
- [169] G.I. Cassab und J.E. Varner, „Immunocytolocalization of extensin in developing soybean seed coats by immunogold-silver staining and by tissue printing on nitrocellulose paper“, *The Journal of Cell Biology*, vol. 105 (6Pt1), 1987, S. 2581-2588.
- [170] K.R. Hood, R.A. Baasiri, S.E. Fritz und E.E. Hood, „Biochemical and Tissue Print Analyses of Hydroxyproline-rich Glycoproteins in Cell Walls of Sporophytic Maize Tissues“, *Plant Physiology*, vol. 96 (4), 1991, S. 1214-1219.
- [171] Z.H. Ye und J.E. Varner, „Tissue-Specific Expression of Cell Wall Proteins in Developing Soybean Tissues“, *The Plant Cell*, vol. 3 (1), 1991, S. 23-37.
- [172] C.A. Conley und M.R. Hanson, „Tissue-Specific Protein Expression in Plant Mitochondria“, *The Plant Cell*, vol. 6 (1), 1994, S. 85-91.
- [173] G.I. Cassab, J.-J. Lin, L.-S. Lin und J.E. Varner, „Ethylene Effect on Extensin and Peroxidase Distribution in the Subapical Region of Pea Epicotyls“, *Plant Physiology*, vol. 88 (3), 1988, S. 522-524.
- [174] P.D. Reid, E. Del Campillo und L.N. Lewis, „Anatomical Changes and Immunolocalization of Cellulase during Abscission as Observed on Nitrocellulose Tissue Prints“, *Plant Physiology*, vol. 93 (1), 1990, S. 160-165.
- [175] J.E. Varner, Y.-R. Song, L.-S. Lin und H. Yuen, „The role of wall proteins in the structure and function of plant cell walls“, *The molecular basis of plant development*, R.B. Goldberg, Hrsg., New York: Alan R. Liss, 1989, S. 161-168.
- [176] P.D. Reid, *Tissue Printing: Tools for the Study of Anatomy, Histochemistry, and Gene Expression*, Academic Press, 1992.

- [177] W.I. Lipkin und M.B. Oldstone, „Analysis of endogenous and exogenous antigens in the nervous system using whole animal sections“, *Journal of Neuroimmunology*, vol. 11 (3), 1986, S. 251-257.
- [178] M. Hernandez Bronchud, S. Webb und M.M. Esiri, „Brain blotting: a method to detect multiple DNA copies in specific brain regions“, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 36 (9), 1988, S. 1191-1195.
- [179] C.M. McGrath, J.L. Grudzien, D.A. Decker und T.O. Robbins, „Cytometrically coherent transfer of receptor proteins on microporous membranes“, *BioTechniques*, vol. 11 (3), 1991, S. 352-361.
- [180] J.R. Matyas, H. Benediktsson und J.B. Rattner, „Transferring and culturing an architecturally intact layer of cells from animal tissue on membrane substrates“, *BioTechniques*, vol. 19 (4), 1995, S. 540-544.
- [181] J.M. McDonald, J.R. Matyas, J.P. Rattner und J.B. Rattner, „Tissue transfers: substrates for cytology and cytochemistry of animal tissues“, *Histology and Histopathology*, vol. 14 (4), 1999, S. 1341-1346.
- [182] A. Herrmann, H.W. Pau, D. Behrend, M. Löbler, W. Schmidt und K.P. Schmitz, „Immunhistochemischer Nachweis gewebespezifischer Substanzen im Tissue Print von Gefrierschliffen humaner Felsenbeine“, *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering. Suppl.*, vol. 51, 2007, S. 125-126.
- [183] J.M. Gershoni und G.E. Palade, „Protein blotting: principles and applications“, *Analytical Biochemistry*, vol. 131 (1), 1983, S. 1-15.
- [184] R.E. Dickerson, H.B. Gray und M.Y. Darensbourg, *Prinzipien der Chemie*, 2. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter, 1988.
- [185] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs und W. Gerok, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2005.
- [186] F.W. van Leeuwen und D.F. Swaab, „Specific immunoelectronmicroscopic localization of vasopressin and oxytocin in the neurohypophysis of the rat“, *Cell and Tissue Research*, vol. 177 (4), 1977, S. 493-501.
- [187] C. Mariac, M. Rougier, T. Gaude und C. Dumas, „Effects of fixatives on the antigenicity of Brassica S-locus specific glycoproteins and rapid immunolocalization by using the tissue print technique“, *Protoplasma*, vol. 166 (3), 1992, S. 223-227.
- [188] H. Robenek, *Mikroskopie in Forschung und Praxis*, Darmstadt: GIT-Verlag, 1999.
- [189] M. Pluta, *Advanced Light Microscopy: Specialized Methods, Bd. 2*, Amsterdam: Elsevier Science Ltd, 1993.
- [190] F.W.D. Rost, *Fluorescence microscopy*, Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1995.
- [191] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch und H. Heinz, „Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie: Grundlagen“, Carl Zeiss Jena, 45-0029 d/09.03.
- [192] K. Engelke, M. Karolczak, A. Lutz, U. Seibert, S. Schaller und W. Kalender, „Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure“, *Der Radiologe*, vol. 39 (3), 1999, S. 203-212.



- [193] C.A. Conley und M.R. Hanson, „Cryostat tissue printing: an improved method for histochemical and immunocytochemical localization in soft tissues“, *BioTechniques*, vol. 22 (3), 1997, S. 488-496.
- [194] E.S. Pierson, B.H. de Graaf und J. Derksen, „Immunofluorescence localization of glycoproteins using tissue printing: detection of pistil extensin-like proteins in tobacco“, *BioTechniques*, vol. 26 (3), 1999, S. 450-453.
- [195] S.M. Gaston, M.A. Soares, M.M. Siddiqui, D. Vu, J.M. Lee, D.L. Goldner, M.J. Brice, J.C. Shih, M.P. Upton, G. Perides, J. Baptista, P.T. Lavin, B.N. Bloch, E.M. Genega, M.A. Rubin und R.E. Lenkinski, „Tissue-print and print-phoresis as platform technologies for the molecular analysis of human surgical specimens: mapping tumor invasion of the prostate capsule“, *Nature Medicine*, vol. 11 (1), 2005, S. 95-101.
- [196] S.M. Gaston und M.P. Upton, „Tissue print micropeel: a new technique for mapping tumor invasion in prostate cancer“, *Current Urology Reports*, vol. 7 (1), 2006, S. 50-56.
- [197] B.A. Barres, „The tissue print method“, *H. Kettenmann and R. Grantyn (eds): Practical Electrophysiological Methods*, New York: Wiley-Liss, 1992, S. 96-100.
- [198] R.F. Pont-Lezica und J.E. Varner, „Histochemical localization of cysteine-rich proteins by tissue printing on nitrocellulose“, *Analytical Biochemistry*, vol. 182 (2), 1989, S. 334-337.
- [199] Cochlear<sup>TM</sup>, „Temporal bone processing methode“, *I50476AE (2)*, Hannover, 2002, S. 1-15.
- [200] F. Lallemand, R. Vandenbosch, S. Hadjab, M. Bodson, I. Breuskin, G. Moonen, P.P. Lefebvre und B. Malgrange, „New insights into peripherin expression in cochlear neurons“, *Neuroscience*, vol. 150 (1), 2007, S. 212-222.
- [201] N. Yu, M.-L. Zhu und H.-B. Zhao, „Prestin is expressed on the whole outer hair cell basolateral surface“, *Brain Research*, vol. 1095 (1), 2006, S. 51-58.
- [202] J. Gao, X. Wang, X. Wu, S. Aguinaga, K. Huynh, S. Jia, K. Matsuda, M. Patel, J. Zheng, M. Cheatham, D.Z. He, P. Dallos und J. Zuo, „Prestin-based outer hair cell electromotility in knockin mice does not appear to adjust the operating point of a cilia-based amplifier“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104 (30), 2007, S. 12542-12547.
- [203] P.R. Thorne, L. Carlisle, G. Zajic, J. Schacht und R.A. Altschuler, „Differences in the distribution of F-actin in outer hair cells along the organ of Corti“, *Hearing Research*, vol. 30 (2-3), 1987, S. 253-265.
- [204] A. Flock, A. Bretscher und K. Weber, „Immunohistochemical localization of several cytoskeletal proteins in inner ear sensory and supporting cells“, *Hearing Research*, vol. 7 (1), 1982, S. 75-89.

## Thesen

- 1) Ein Cochlear-Implantat (CI) gilt als ideal, wenn es durch direkte elektrische Reizung verschiedener Ganglienzellen des cochleären Ganglion spirale einen optimalen Höreindruck erzeugt und dabei möglichst atraumatisch implantiert werden kann.
- 2) Mit endostealen CI-Elektroden (Positionierung des Elektrodenträgers zwischen dem häutigen und knöchernen Labyrinth lateral des Lig. spirale) können die für eine erfolgreiche Hörwahrnehmung relevanten cochleären Strukturen bei der Implantation geschont und das Restgehör erhalten werden.
- 3) Entscheidend für den Erfolg der endostealen Elektrodeninsertion ist die Vermeidung der Eröffnung der flüssigkeitsgefüllten Räume des Innenohres. Die Wahrung der cochleären Membranintegrität ist somit ein wichtiges Gütekriterium der endostealen CI-Elektroden, welches vor der klinischen Anwendung mit Hilfe von Probeinsertionen in post-mortem Felsenbeinpräparate überprüft werden muss.
- 4) Um bei Probeinsertionen eine sichere Unterscheidung zwischen insertions- und präparationsbedingten Traumata gewährleisten zu können, sollen histologische Untersuchungen bevorzugt an nativen, uneingebetteten Felsenbeinpräparaten erfolgen.
- 5) Durch die Anwendung einer schonenden Kryoschliffpräparationsmethode kann eine, im Vergleich zur Präparateinbettung in Kunststoff, deutlich artefaktärmere histologische Untersuchung gewährleistet werden.
- 6) Für eine optimale Kryoschliffpräparation muss die Kryoschleifvorrichtung (KSV) gut zu handhaben sein und eine kontinuierliche Kühlung sowie Fixierung des Präparates gewährleisten. Diese Anforderungen können durch die Verwendung eines neuen, konstruktiv optimierten KSV-Prototyps, welcher sich durch eine verbesserte Isolierung des Kühlmittels  $\text{CO}_2 \text{ solid}$  und einem bei geschlossener Isolierung ermöglichten Präparatvorschub auszeichnet, erfüllt werden.
- 7) Durch eine optimierte Kryofixierung können die besonders empfindlichen cochleären Strukturen stabilisiert und die Dislokation einer inserierten Simulations-Elektrode während der Schliffpräparation vermieden werden.

- 8) Kryofixierte cochleäre Gewebestrukturen hinterlassen durch die Druckeinwirkung beim „Tissue Printing“ ein Relief (physikalischer Print) in der Printmembran, welches stereomikroskopisch gut beurteilt werden kann und eine detaillierte Darstellung der Scalae tympani et vestibuli mit der Lamina basilaris, der Lamina spiralis ossea, dem Ligamentum spirale sowie der endostealen Region ermöglicht.
- 9) Von einer Gefrierschliffebene können beliebig viele „Tissue Prints“ angefertigt werden, da bereits durch eine sehr kurze Schleifdauer eine neue Zelllage eröffnet und so für einen erneuten Proteinübergang zugänglich gemacht werden kann.
- 10) Im Rahmen des „Tissue Printings“ können Proteine von der Felsenbeinpräparatschliffebene auf eine Printmembran transferiert werden (chemischer Print). In der Matrix der Printmembran werden die transferierten Proteine derart immobilisiert, dass deren histologische Lokalisation bewahrt bleibt und sie für immunhistochemische Nachweismethoden zugänglich sind.
- 11) Damit Proteine auf die Printmembran transferiert werden können, muss die Temperatur im Bereich der Kryopräparatschliffebene über den Gefrierpunkt angehoben werden, ohne dabei gleichzeitig eine kontinuierliche Kryofixierung des Felsenbeinpräparates zu gefährden. Durch eine Benetzung der Kryopräparatschliffebene mit einer 30%igen bzw. 40%igen Glycerollösung kann der Gefrierpunkt oberflächlich erniedrigt, ein Proteintransfer ermöglicht und die Anpresszeit beim „Tissue Printing“ verlängert werden.
- 12) Eine verlängerte Anpresszeit resultiert in einer vergrößerten transferierten Proteinmenge mit folglich erhöhtem Antigengehalt der Printmembran, wodurch die Qualität der immunhistochemischen Nachweisreaktion verbessert werden kann.
- 13) Mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenz können die transferierten cochleären Proteine auf der Printmembran nachgewiesen werden.  
Somit kann die spezifische Beurteilung von Membranstrukturen (Kollagen Typ IV) und Strukturen der lateralen cochleären Wand (Connexin 26), deren Integrität für eine erfolgreiche endosteale Elektrodeninsertion entscheidend ist, ermöglicht werden.
- 14) Das „Tissue Printing“ kryofixierter und -geschliffener Felsenbeinpräparate mit anschließender Immunfluoreszenzdarstellung transferierter Proteine stellt eine geeignete Methode zur Beurteilung der cochleären Feinstrukturen und zur Evaluation neuer CI-Elektroden dar.

- 
- 15) Mit dem Verfahren des „Tissue Printings“ kryofixierter und -geschliffener Präparate können auch viele andere empfindliche Gewebe, für deren Beurteilung ein natives Belassen entscheidend ist, histologisch untersucht werden. Durch die Vielzahl der zur Verfügung stehenden Antikörpersysteme können dank der immunhistochemischen Färbung der „Tissue Prints“ verschiedene Proteine spezifisch detektiert und somit unterschiedlichste Fragestellungen untersucht werden.

## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die hier vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den .....

.....

Svea Mühlberg

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H. W. Pau (Universität Rostock, Medizinische Fakultät) für die Überlassung des interessanten Themas sowie seine freundliche und stete Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. habil. D. Behrend (Universität Rostock, Fakultät für Maschinenbau und Schiffstechnik) für sein unermüdliches Engagement sowie die Hilfsbereitschaft, Geduld und vielen motivierenden Worte, die die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Dr.-Ing. O. Specht, Herrn Dr.-Ing. H. Martin sowie Herrn Dr. rer. nat. habil. M. Löbler danke ich für ihre jederzeit gewährte Hilfe und die zahlreichen wertvollen Anregungen.

Ich möchte mich außerdem ganz herzlich bei den vielen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Biomedizinische Technik Rostock für ihren Einsatz und die sehr nette Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Frau A. Rohde, Frau G. Karsten, Frau B. Hummel, Herrn P. Enzenross sowie Herrn J. Großmann.

Des Weiteren gilt mein großer Dank Katharina Wegner, die mir an langen Arbeitstagen im Labor voller Tatkraft zur Seite stand, dabei mit Ihrer fröhlichen Begeisterung für experimentelles Arbeiten so herrlich ansteckend war und mir eine gute Freundin geworden ist.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich von ganzem Herzen für ihr Verständnis und ihre Nachsicht während den mitunter turbulenten Zeiten meines Medizinstudiums sowie für die zahlreichen aufmunternden Worte und die abschließende tatkräftige Unterstützung beim Korrekturlesen meiner Dissertation.